
Masterarbeit

Frau B. Sc.
Sophie Thamm

Immobilisierung von DNA-Origami
in mikro- und nanostrukturierten
Oberflächen

Chemnitz, 2015

Masterarbeit

Immobilisierung von DNA-Origami in mikro- und nanostrukturierten Oberflächen

Autor:

Frau B. Sc.

Sophie Thamm

Studiengang:

Molekularbiologie/Bioinformatik

Seminargruppe:

MO13w1-M

Erstprüfer:

Frau Prof. Petra Radehaus

Zweitprüfer:

Herr Dipl.-Ing. Christian Helke

Einreichung:

Mittweida, 30. November 2015

Bibliografische Beschreibung:

Thamm, Sophie:

Immobilisierung von DNA-Origami in micro- und nanostrukturierten Oberflächen. 2015.

9 Seiten Verzeichnisse, 78 Seiten Inhalt, 4 Seiten Anhang – Seiten insgesamt: 92

Mittweida, Hochschule Mittweida, Fakultät für angewandte Computer- und Biowissenschaften, Masterarbeit, 2015

Referat:

Im Rahmen des Exzellenz-Cluster cfaed werden am Zentrum für Mikrotechnologie der TU Chemnitz und dem Fraunhofer Institut für Elektrische Nanosysteme die Immobilisierung von DNA-Origami in mikro- und nanostrukturierten Oberflächen untersucht. Die DNA-Origami zeigen auf Mica, Siliziumdioxid und hydrophoben Polymeren ein signifikant unterschiedliches Bindeverhalten. Dies bildet die Grundlage für die Immobilisierung in hydrophilen Kavitäten in einem hydrophoben Umfeld. Es werden drei verschiedene Integrationsansätze untersucht und beurteilt.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis.....	III
Abkürzungsverzeichnis.....	VI
1 Einleitung	1
2 Grundlagen.....	5
2.1 Struktur der DNA und chemische Eigenschaften.....	5
2.2 DNA-Nanotechnologie und DNA-Origami	7
2.3 Nanoimprint-Lithographie.....	10
2.4 Interaktion zwischen DNA und Oberflächen	13
2.5 Konzepte für die gezielte Immobilisierung von DNA-Origami.....	15
2.5.1 Verstärkung des Polaritätsunterschiedes	17
2.5.2 Molekularer Lift-off	18
2.5.3 Elektrostatische Felder	20
3 Material und Methoden.....	23
3.1 Material.....	23
3.1.1 Substrate	23
3.1.2 Biologische Proben.....	23
3.1.3 Chemikalien und Geräte.....	25
3.2 Methoden	26
3.2.1 Oberflächenmodifikation	26
3.2.2 Nanoxerographie.....	26
3.2.3 Probenpräparation	26
3.2.4 Analytische Methoden	28
4 Untersuchung der DNA-Immobilisierung	32
5 Nanoimprint-Lithographie	39
6 Immobilisierung von DNA-Origami.....	44
6.1 Unstrukturierte Oberflächen	44
6.1.1 Mica	45
6.1.2 Thermisches Siliziumdioxid	48

6.1.3	DLC (Diamond like Carbon)	57
6.1.4	CF (Carbon-Fluorid)	60
6.1.5	HMDS (Hexamethyldisilazan)	62
6.1.6	Auswertung des Ansatzes nach <i>Helke et al.</i>	64
6.2	<i>Oberflächenpotential</i>	65
6.3	<i>Molekularer Lift-off</i>	69
6.4	<i>Elektrostatische Felder</i>	72
7	Zusammenfassung	74
8	Ausblick	76
Literatur	VII
Anlagen	XI
Selbstständigkeitserklärung	XIII

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Strukturelle Merkmale der DNA.....	6
Abbildung 2: Meilensteine der DNA-Nanotechnologie	8
Abbildung 3: DNA-Origami Technik	9
Abbildung 4: DNA-Origami als Templat für die Funktionalisierung	10
Abbildung 5: Strukturübertragung bei der Fotolithographie	11
Abbildung 6: Schema Elektronenstrahl-Lithographie.....	12
Abbildung 7: Schema des NIL-Prozesses	12
Abbildung 8: Immobilisierung der DNA-Origami nach <i>Kershner et al.</i>	16
Abbildung 9: Immobilisierung der DNA-Origami nach <i>Gopinath/Rothmund</i>	17
Abbildung 10: Substrataufbau des 6-Inch-Wafers.....	18
Abbildung 11: Lift-off nach <i>Pillers et al.</i>	19
Abbildung 12: Molekularer Lift-off	19
Abbildung 13: Schema der Nanoxerographie.....	20
Abbildung 14: EDL: Eine Kombination aus Nanoxerographie und Microdroplets	21
Abbildung 15: tPad®-Design und AFM-Aufnahmen	24
Abbildung 16: Pad-Design und AFM-Aufnahme	25
Abbildung 17: 6HB-Design und AFM-Aufnahme	25
Abbildung 18: Strukturformel des Fluoreszenzfarbstoffes YOYO-1 und Interkalation in dsDNA	28

Abbildung 19: Schematischer Aufbau des AFM.....	29
Abbildung 20: Immobilisierung von Lachsspermien-DNA in TAE-Puffer auf Mica, gespült mit millipore-Wasser.....	33
Abbildung 21: Immobilisierung von Lachsspermien-DNA in TAE-Puffer auf Mica, gespült mit Ethanol.....	34
Abbildung 22: Immobilisierung von Lachsspermien-DNA in TE-Puffer auf Mica, gespült mit millipore-Wasser.....	35
Abbildung 23: Immobilisierung von Lachsspermien-DNA in TE-Puffer auf Mica, gespült mit Ethanol	36
Abbildung 24: Kombination von <i>eBeam</i> und NIL für die Strukturen im Nanometerbereich	39
Abbildung 25: NIL-Layout für die geplante Immobilisierung der tPads® und 6HB.....	40
Abbildung 26: NIL-Master für die tPads® und 6HB (REM-Aufnahmen).....	41
Abbildung 27: NIL-Arbeitsstempel für die tPads® (REM-Aufnahmen)	41
Abbildung 28: Ätzen mit CF ₄ -Plasma der ersten Lackschicht, 24 sec (REM-Aufnahmen) ...	42
Abbildung 29: Ätzen mit O ₂ -Plasma der zweiten Lackschicht, 2 min (REM-Aufnahmen) ...	43
Abbildung 30: Immobilisierung der DNA-Origami auf Mica	47
Abbildung 31: Immobilisierung der DNA-Origami auf Siliziumdioxid	50
Abbildung 32: Immobilisierung der DNA-Origami auf Siliziumdioxid nach Modifikation 1	52
Abbildung 33: Immobilisierung der DNA-Origami auf Siliziumdioxid nach Modifikation 2	54
Abbildung 34: Immobilisierung der DNA-Origami auf Siliziumdioxid nach Modifikation 3	56
Abbildung 35: Immobilisierung der DNA-Origami auf DLC.....	59
Abbildung 36: Immobilisierung der DNA-Origami auf CF	61

Abbildung 37: Immobilisierung der DNA-Origami auf HMDS.....	63
Abbildung 38: KPFM-Messungen.....	68
Abbildung 39: Stabilität der tPads® unter mechanischer Einwirkung gegenüber verschiedenen Detergenzien für einen molekularen Lift-off	70
Abbildung 40: Stabilität der tPads® gegenüber verschiedenen Detergenzien für einen molekularen Lift-off	71
Abbildung 41: Positionierung der Lachsspermien-DNA mittels Nanoxerographie und EDL	73

Abkürzungsverzeichnis

µm	Mikrometer
AFM	Rasterkraftmikroskop oder Rasterkraftmikroskopie (<i>engl. atomic force microscopy</i>)
APTES	3-Aminopropyltriethoxysilan
bp	Basenpaare (<i>basepairs</i>)
CF	Carbon Fluoride
CMOS	komplementärer Metalloxid-Halbleiter (<i>complementary metal–oxide–semi-conductor</i>)
DI-Wasser	Destilliertes Wasser
DLC	Diamond-like Carbon
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxyribonucleicacid</i>)
dsDNA	Doppelsträngige DNA (<i>doublestranded DNA</i>)
eBeam	Elektronenstrahl-Lithographie (<i>electron beam lithography</i>)
EDL	<i>electric-droplet lithography</i>
HMDS	Hexamethyldisilazan
IC	Integrierte Schaltkreise (<i>integrated circuits</i>)
KPFM	<i>kelvin-probe force microscopy</i>
mM	Milli-Mol
NIL	Nanoimprint-Lithographie
nm	Nanometer
nM	Nano-Mol
pM	Piko-Mol
PMMA	Polymethylmethacrylat
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleicacid</i>)
sccm	Standardkubikzentimeter pro min
ssDNA	Einzelsträngige DNA (<i>singlestranded DNA</i>)

1 Einleitung

Die Idee des integrierten Schaltkreises (*IC – Integrated Circuits*) – ein Schaltkreis, der auf einem einzelnen Halbleiterelement (Chip) untergebracht ist – hat die elektronische Entwicklung revolutioniert. Die *ICs* sind hinsichtlich ihrer Zuverlässigkeit, Leistungsfähigkeit, des geringen Platz- und Gewichtsbedarfes nicht zu überbieten. Nur wenige Jahre nach dieser richtungsweisenden Erfindung postulierte Gordon Moore 1965 eine Gesetzmäßigkeit, die besagt, dass sich die Anzahl der Transistoren pro Flächeneinheit alle 18 Monate verdoppelt – das *Moore'sche Gesetz* (publiziert in *Electronics International*). Diese stetige und tatsächlich eintretende Verdopplung der Integrationsdichte begründet den technologischen Fortschritt in der Halbleitertechnik und das digitale Zeitalter. Damit geht die Miniarisierung der Bauteile einher, um steigende Rechenkapazitäten, schnellere Verarbeitungs- und Übertragungszeit von Signalen zu realisieren. Bis heute konnte die Steigerung der Integrationsdichten mit einer stetigen Verfeinerung der Auflösung der Fotolithographie kompensiert werden. Für die Zukunft scheint die Realisierung der kontinuierlich steigenden Anforderungen an Leistung und Funktionalität anhand des *Top-Down*-Verfahrens (Fotolithographie) jedoch begrenzt. Um weiterhin den technologischen Fortschritt zu gewährleisten, werden neue Ansätze und Ideen benötigt.

Innerhalb der Wissenschaft werden drei Möglichkeiten zur Steigerung der Integrationsdichten verfolgt – „*More than Moore*“, „*More Moore*“ und „*Beyond CMOS*“ (komplementärer Metalloxid-Halbleiter, *Complementary Metal–Oxide–Semiconductor*) (Balestra & Clerc). Der „*More than Moore*“-Ansatz versteht sich als Weiterentwicklung des Moore'schen Gesetz und setzt statt auf Verkleinerung auf die Etablierung völlig neuer Funktionen auf einem Chip. „*More Moore*“ umfasst die Entwicklung neuer Strukturierungsmethoden im *Top-Down*-Bereich, um immer kleiner werdende Strukturen realisieren zu können. „*Beyond CMOS*“ sieht eine völlig neue Herangehensweise vor. Neben der Etablierung neuer, alternativer Strukturierungsmethoden im *Top-Down* Bereich analog der „*More Moore*“-Philosophie, wird der *Bottom-Up*-Ansatz verfolgt. Dieser basiert auf dem Einsatz von Nano-Objekten für die Funktionalisierung und Strukturbildung.

An diesem Punkt setzt das Exzellenz-Cluster **cfaed** („Center for Advancing Electronics Dresden“) an. Das 2012 gegründete internationale Cluster ist darauf ausgelegt, neuartige Methoden zu entwickeln, um Strukturen im Nanometerbereich für zukünftige Photonik- und Transistortechnologien zu entwickeln, *Top-Down* und *Bottom-Up*-Ansätze zu kombinieren und weiter zu entwickeln.

Die Eingliederung im BAC-Pfad (*Biomolecular-Assembled Circuits Path*) impliziert die *Bottom-Up* Methode auf der Basis selbstorganisierender Biomoleküle. N. C. Seeman legte 1982 den Grundstein der DNA-Nanotechnologie, indem er erste künstliche Strukturen aus Nukleinsäuren entwarf (Seeman N. C., 1982). Nukleinsäuren als Konstruktionsmaterial eignen sich optimal, denn sie sind synthetisch herstellbar, kostengünstig zu beziehen und die Bindungsmechanismen sind gut verstanden. Im Rahmen des cfaed-Clusters fungieren DNA-Origami als Template für die Funktionalisierung und die Strukturbildung.

Das Hauptziel am Zentrum für Mikrotechnologien (ZfM) der TU Chemnitz und dem Fraunhofer Institut für elektronische Nanosysteme (ENAS) ist hierbei die hochgenaue und selektive Immobilisierung der DNA-Origami auf mikro- und nanostrukturierten Oberflächen auf Waferlevel (Wafer = kreisrunde Scheiben, die als Substrat elektronische Bauelemente, mikromechanische Bauelemente oder photoelektrische Beschichtungen dienen), also die Kombination aus *Top-Down* und *Bottom-Up*.

Die bisher etablierten Integrationsansätze für DNA-Origami basieren auf der Herstellung hydrophiler Kavitäten in einem hydrophoben Umfeld. Daher beschäftigt sich die vorliegende Arbeit mit der Charakterisierung der Immobilisierungsmechanismen und Einflussfaktoren dreier verschiedener DNA-Origami-Strukturen auf hydrophilen und hydrophoben Oberflächen bei gleichbleibender Versuchsdurchführung.

Mit den erhaltenen Ergebnissen und Beobachtungen wird der mikrofluidische Integrationsansatz für die 6-Inch-Wafer von *Helke et al.* bewertet. Der Versuchsaufbau umfasst die Strukturierung der Wafer mit der Nanoimprint-Lithographie (NIL) und den Einsatz einer zusätzlichen hydrophoben Schicht. Die zusätzliche hydrophobe Schicht dient der Verhinderung der unspezifischen Anlagerung der DNA-Origami. Des Weiteren werden zusätzliche Integrationsansätze entwickelt und getestet, um DNA-Origami selektiv und präzise in den dafür vorgesehenen Bereichen zu immobilisieren.

Nach aktuellem Forschungsstand basiert die Immobilisierung der DNA-Origami im Wesentlichen auf der Hydrophobizität der Oberfläche. Jedoch zeigen die Untersuchungen eine Deposition der DNA-Origami sowohl auf hydrophilen als auch auf hydrophoben Oberflächen. Dabei wird folgende Hypothese zur Diskussion gestellt:

Der Mechanismus der selektiven Bindung von DNA-Origami basiert auf der Oberflächenrauigkeit, der Substratfunktionalisierung, dem Oberflächenpotential und der molekularen Struktur des Objektes.

Zur Bewertung des Integrationsansatzes nach *Helke et al.* und zur Prüfung der Hypothese ist die vorliegende Arbeit folgendermaßen gegliedert: Erläuterung der Grundlagen, Nennung der Methoden und zur Etablierung einer AFM-Alternative/ Untersuchung der allgemeinen Bindemechanismen von doppelsträngiger DNA auf Mica: erste Untersuchungen an Lachsspermien-DNA. Das Ziel dieser Voruntersuchung ist die Entwicklung eines Protokolls für die Immobilisierung von DNA-Origami hinsichtlich eines geeigneten Puffers, des Detergens und der Inkubationszeit. Das Thema des darauffolgenden Kapitels ist die Entwicklung der Nanoimprint-Lithographie (NIL) mit einem neuartigen 2-Lack-System. Die NIL stellt die favorisierte Strukturierungsmethode im Nanometerbereich für den mikrofluidischen Integrationsansatz dar. Kapitel sechs widmet sich der Immobilisierung der DNA-Origami auf hydrophilen und hydrophoben Oberflächen und der Charakterisierung der Bindemechanismen. Das Kapitel beinhaltet zudem zwei weitere Integrationsansätze: der molekulare *Lift-off* und die Immobilisierung basierend auf elektrischen Feldern. Die Methode der Nanoxerographie wird mit dem Rasterkraftmikroskop umgesetzt und ist eine innovative Technik für die gezielte Integration von Nano-Objekten aller Art. Im Anschluss folgen die Zusammenfassung und der Ausblick für diese Arbeit.

Die Immobilisierung der Lachsspermien-DNA wird mithilfe der Rasterkraftmikroskopie und der Fluoreszenzmarkierung untersucht. Die Bindemechanismen von DNA an Mica konnten charakterisiert und ein entsprechendes Protokoll für die DNA-Origami-Immobilisierung erstellt werden. Die Fluoreszenzmethode brachte aufgrund der Umgebungsbedingungen nicht die gewünschten Resultate und ist bezüglich der Auflösung stark limitiert. Die Strukturierung der Wafer mittels NIL konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht umgesetzt werden,

daher wird DNA-Origami auf den unstrukturierten Oberflächen abgeschieden. Die Immobilisierung von DNA-Origami basiert auf zahlreichen Parametern, welche sich gegenseitig beeinflussen. Bisher wurde davon ausgegangen, dass eine hydrophobe Oberfläche zwangsläufig eine abweisende Wirkung auf DNA-Origami hat. Die Untersuchungen zeigen jedoch eine Anlagerung der Strukturen neben hydrophilen, auch auf hydrophoben Oberflächen bei gleichbleibender Präparation und Konzentration. Aufgrund der komplexen Anlagerungsmechanismen der DNA-Origami werden weitere Strukturierungsansätze geprüft. Der molekulare *Lift-off* gestaltet sich jedoch für die tPads® schwierig, da sie schon durch Spülung mit destilliertem Wasser zerstört werden. Basierend auf den Oberflächenpotentialunterschieden wird die Nanoxerographie als alternative Immobilisierungs- und Strukturierungsmethode herangezogen. Mit dieser Methode werden die komplexen Einflussfaktoren der Magnesium-basierten Immobilisierung umgangen und es scheint ein sehr vielversprechender Integrationsansatz zu sein, der für Proteine erprobt ist (Blanco, Nesbitt, Horton, & Mesquida, 2007).

2 Grundlagen

Die gezielte Integration von Nano-Objekten – hier DNA-Origami – ist in der Technik und Wissenschaft von zentraler Bedeutung. In diesem Kapitel werden die Grundlagen dieses Themenbereiches und der aktuelle Stand der Wissenschaft vorgestellt. Hierbei wird der Fokus auf die naturwissenschaftlichen und materialtechnischen Grundlagen zur Immobilisierung von künstlich hergestellten DNA-Origami gelegt. Das erste Unterkapitel beschreibt die strukturellen und chemischen Eigenschaften der DNA, welche die Synthese von DNA-Origami und deren Immobilisierung auf den Oberflächen beeinflusst. Das zweite Unterkapitel legt den thematischen Fokus auf die DNA-Nanotechnologie und DNA-Origami als zentrale Konstruktionstechnik. In Kapitel 2.3 folgt die Nanoimprint-Lithographie als zentrale Strukturierungsmethode. Der vierte Abschnitt charakterisiert das Bindeverhalten der DNA-Origami in Hinblick auf die verwendeten Oberflächen. Basierend auf diesen vier Unterkapiteln wird mit Kapitel 2.5 über die Konzepte zur gezielten Integration der Bogen zur praktischen Arbeit dieses Projektes gespannt.

2.1 Struktur der DNA und chemische Eigenschaften

Die Desoxyribonukleinsäure ist ein Biopolymer und in allen Lebewesen Träger der Erbinformation. Die DNA besteht aus vier verschiedenen Monomeren, den Desoxyribonukleotiden, die durch kovalente Bindungen miteinander verknüpft sind. Jedes dieser Nukleotide (Abbildung 1a) setzt sich aus einem Zucker – der Desoxyribose –, einem Phosphatrest und einer organischen Base zusammen. Dabei befindet sich die Base am 1'-Kohlenstoffatom des Zuckers und die Verbindung der Nukleotide untereinander ist durch die Phosphodiesterbindungen der Phosphatgruppen zwischen den 3'- und 5'-Kohlenstoffatomen hergestellt. Die organischen Basen werden unterteilt in die Purinbasen (Adenin und Guanin) und die Pyrimidinbasen (Thymin und Cytosin). Sie bilden mit der Desoxyribose eine β -glykosidische Verbindung. In wässriger Lösung lagern sich zwei solcher Einzelstränge als Doppelhelix zusammen; es entsteht die Sekundärstruktur (*dsDNA* – *doublestranded DNA*) (Watson & Crick, 1953). Die Helixbildung basiert auf der Watson-Crick-Basenpaarung und damit auf

der Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen je einer Purin- (Adenin und Guanin) und einer Pyrimidinbase (Thymin und Cytosin). Dabei paaren sich Adenin und Thymin durch die Ausbildung von zwei (Abbildung 1c), Guanin und Cytosin durch die Ausbildung von drei Wasserstoffbrückenbindungen (Abbildung 1d).

Die B-DNA ist die häufigste Form in der belebten Natur. Abbildung 1e/f zeigt die Seitenansicht und die Draufsicht dieser Form. Ihre Stränge verlaufen antiparallel zueinander und sind in einer rechtsgedrehten Schraube um eine gemeinsame Achse gewunden. Die stickstoffhaltigen Basen - untereinander durch die Watson-Crick-Paarung verknüpft - sind auf der Innenseite der Doppelhelix lokalisiert, wohingegen sich außen das Zucker-Phosphat-Rückgrat befindet. Eine vollständige Windung der Doppelhelix umfasst 10,4 Basenpaare und ist 3,4 nm hoch. Der Durchmesser der DNA-Doppelhelix liegt bei 2 nm. Ein weiteres wichtiges Merkmal ist das Vorhandensein einer großen und einer kleinen Furche. Die Furchen entstehen durch die π - π -Wechselwirkungen (*blunt end stacking*), die zwischen übereinanderliegenden Nukleobasen (Abbildung 1b) aufgrund einer Elektronendelokalisierung herrschen und die Stabilität und gerichtete Steifigkeit der Helix bedingen (Henning, 2012).

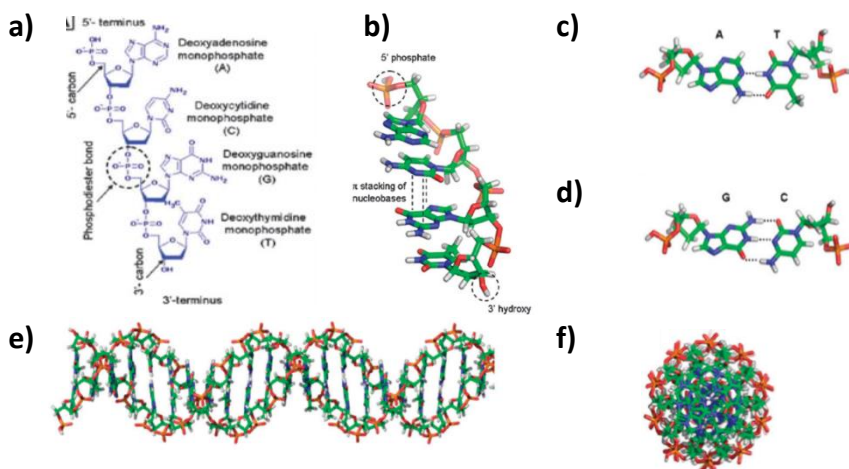


Abbildung 1: Strukturelle Merkmale der DNA

Dargestellt sind a) der Einzelstrang (ssDNA – singlestranded DNA) mit dem Zucker-Phosphat-Rückgrat und den vier organischen Basen (Adenin, Cytosin, Guanin, Thymin); b) die Seitenansicht des Einzelstranges mit dem Fokus auf die π - π -Wechselwirkungen; c) Watson-Crick-Basenpaarung zwischen Adenin und Thymin und d) zwischen Guanin und Cytosin; e) Seitenansicht der rechtsgängigen B-DNA und f) deren Draufsicht (entnommen aus (Becerril & Woolley, 2009)).

DNA-Moleküle sind in wässriger Lösung und bei neutralem pH-Wert negativ geladen; sie sind Polyanionen. Jede Phosphatgruppe im Rückgrat ist negativ geladen. Nur im extrem sauren pH-Bereich < 1 werden die Phosphatgruppen protoniert. Ab einem pH-Wert von 6,8

wird in Richtung des alkalischen Bereichs ein zweites Proton abgespalten (Blackburn & Gait, 1996). Der Säure-Base-Charakter der Nukleotide bestimmt die Ladung, die tautomerische Struktur (Positionierung der Wasserstoffatome und Doppelbindungen im Molekül) und die Fähigkeit Wasserstoffbrückenbindungen einzugehen. Zwischen pH 5 und pH 9 sind die Basen ungeladen. Bei pH-Werten außerhalb dieses Bereiches führt eine Protonierung ($\text{pH} < 5$) oder Deprotonierung ($\text{pH} > 9$) zur Auflösung einer Wasserstoffbrückenbindung und damit zur Destabilisierung des Doppelstranges (Alberts, et al., 2012).

Für alle Biomoleküle ist es notwendig, mit dem essentiellen Medium Wasser in Wechselwirkung zu treten. Nukleinsäuren sind aufgrund des polyionischen Charakters in Wasser löslich. Das Phosphatrückgrat verhält sich hydrophil, der Kern mit den innen liegenden Basen ist hydrophob (Benke, 2007). Die Struktur und die chemischen Eigenschaften der DNA legen den Grundstein für die Strukturbildung und die Applikationen in der DNA-Nanotechnologie, welche im folgenden Kapitel thematisiert werden.

2.2 DNA-Nanotechnologie und DNA-Origami

Die Nanotechnologie kann einerseits als Fortsetzung und Erweiterung der Mikrotechnik angesehen werden (*Top-Down-Ansatz*), andererseits erfordert der andauernde Anstieg der Integrationsdichte und die damit einhergehende Miniaturisierung unkonventionelle neue Ansätze. Allen Nano-Forschungsgebieten liegt die gleiche Größenordnung der Teilchen bis zu 100 nm zugrunde. Die Chemie folgt in der Nanotechnologie oft dem entgegengesetzten Ansatz: *Bottom-Up*. So werden aus einer Vielzahl von Moleküleinheiten größere nanoskalige Molekülverbände aufgebaut. Die DNA-Nanotechnologie umfasst das Design und die Erzeugung von künstlich hergestellten DNA-Strukturen für die technische Anwendung. Basierend auf der molekularen Selbstassemblierung der Biomoleküle werden die Nukleinsäuren, DNA und RNA (Ribonukleinsäure), außerhalb der Zelle einer neuen Bedeutung zugeführt. Durch den Entwurf künstlicher Nukleinsäure-Architekturen aus synthetischer DNA legte Nadrian Seeman 1982 die konzeptionelle Grundlage für die DNA-Nanotechnologie (Seeman N. C., 1982). Die Konstruktionen weisen einen Verzweigungspunkt auf (verzweigte *DNA-Junction* in Abbildung 2a). Diese *Junction*-Motive verfügen hauptsächlich über drei oder vier Arme, welche aus doppelhelikaler dsDNA bestehen. Diese *DNA-Junctions* sollten in

3D organisiert werden, um Proteine zu platzieren (Abbildung 2b). Anfang der neunziger Jahre stellte Nadrian Seeman die erste DNA-basierte supramolekulare Struktur vor: einen 3D-Würfel aus sechs einzelsträngigen DNA-Schleifen (Seeman & Chen, 1991) (Abbildung 2c).

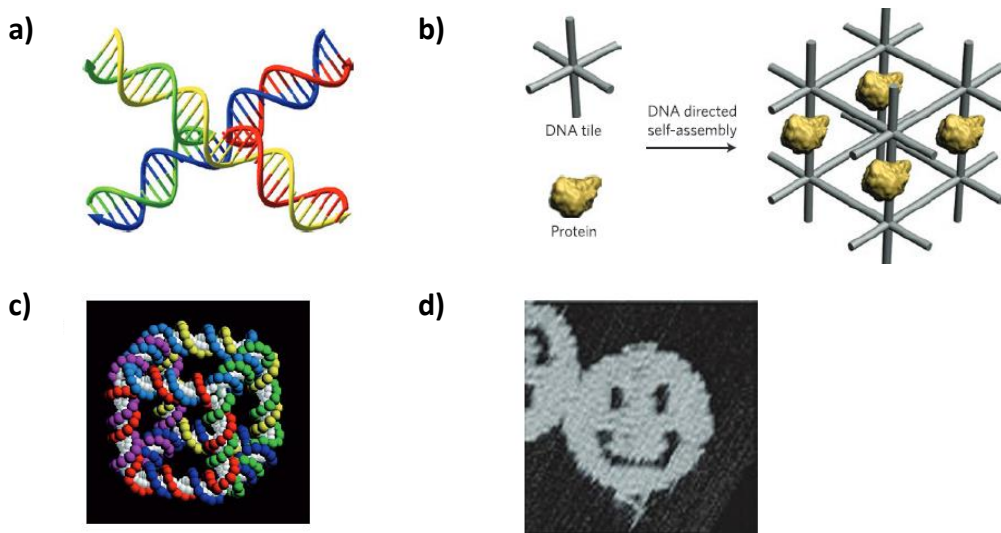


Abbildung 2: Meilensteine der DNA-Nanotechnologie

Die Meilensteine der Methoden in der DNA-Nanotechnologie zeigen die ersten entwickelten Strukturen: a) die verzweigten DNA-Junctions, mit deren Hilfe in b) Proteine positioniert werden sollten und c) die erste supramolekulare Struktur, der 3D-Würfel von N. C. Seeman und d) die DNA-Origami-Technik von P. Rothemund (entnommen aus (Pinheiro, Han, Shih, & Yan, 2011)).

Mit der verwendeten Technik ist es nicht möglich mehrere gleichgroße Strukturen zu synthetisieren. Hier schafft eine weitere Technik Abhilfe: DNA-Origami (Abbildung 2d, Abbildung 3). Die DNA-Origami-Technik, von Paul Rothemund im Jahr 2006 publiziert, nutzt ein langes einzelsträngiges, virales DNA-Molekül (*scaffold strand*), um gewünschte Muster und Formen auf der Nanometerskala herzustellen. Der *scaffold strand* wird durch hunderte synthetisch hergestellte und kurze Oligonukleotide (*staple strands*) in die gewünschte Form gefaltet (Rothemund, 2006).

Rothemund nutzte als *scaffold strand* eine 7249 Basen lange, modifizierte Version des Genoms des M13mp18 Bakteriophagen. Die DNA-Origami-Technik basiert auf molekularer Selbstassemblierung. Aufgrund der komplementären Basenpaarung hybridisieren die *staple strands* mit den jeweiligen Sequenzen des *scaffold strands* und es entstehen ohne lenkende Wirkung von außen die definierten Formen.

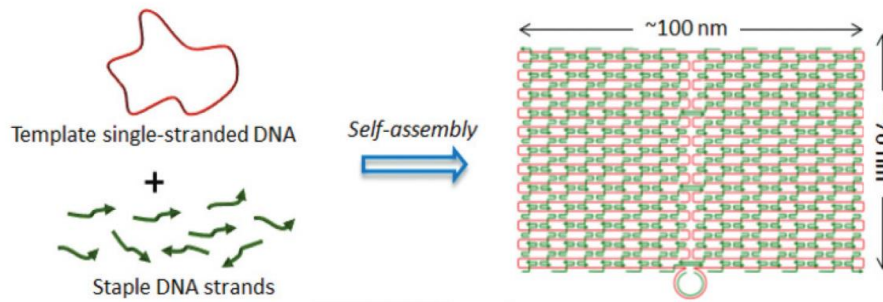


Abbildung 3: DNA-Origami Technik

Schematisch dargestellt ist die Herstellung einer DNA-Origamistruktur aus scaffold strand und staple strands basierend auf der Fähigkeit der Selbstassemblierung der Biomoleküle (entnommen aus (Endo, Yang, & Sugiyama, 2012)).

Die Vorteile dieser Methode sind die einfache Herstellung, die hohe Ausbeute und die geringen Kosten. Der Entwurf der DNA-Origami hat sich durch die Entwicklung eines CAD Softwarepaketes namens caDNAno stark vereinfacht. Die möglichen Anwendungen gestalten sich vielseitig: Hüllen für den Wirkstofftransport, Positionierung von Nanopartikeln, Herstellung von Auflösungslinealen für die Lichtmikroskopie und die Herstellung von DNA-Maschinen (Rothemund, 2006).

Im Rahmen des cfaed-Clusters fungiert DNA-Origami als Templat, das funktionalisiert und gezielt in mikro- und nanostrukturierte Oberflächen integriert werden soll. Abbildung 4 zeigt die zwei an der TU Dresden hergestellten Hauptstrukturen: die eindimensionalen Six-Helix-Bundles, im folgenden 6HB genannt, und die zweidimensionalen tPads[®]. Die 6HB stellen ein zyklisches DNA-Motiv dar, welches aus sechs DNA-Doppelhelices besteht (Abbildung 4). Zusätzlich sieht der Aufbau mehrere Bindestellen für eine gezielte Funktionalisierung mit z.B. Goldnanopartikeln vor (Abbildung 4a2/3). Sie sind 400 nm lang und ihr Durchmesser beträgt 6 nm. Das 100 x 100 nm² tPad[®] ist das zweite Hauptmotiv, es ist zweidimensional und rahmenartig mit einer Breite von ca. 25 nm aufgebaut (Abbildung 4b1). Bisher ist diese Struktur nicht basenkorrigiert, sodass es zu intrinsischen Spannungen des tPads[®] kommen kann. An der TU Dresden werden die tPads[®] nach zwei Ansätzen funktionalisiert. Eine Möglichkeit besteht in der Integration einer dreiarmligen monohelikalen oder doppelhelikalen Strebe, welche z.B. mit Goldnanopartikeln funktionalisiert werden kann. Der zweite verfolgte Ansatz besteht in der Anlagerung von wasserlöslichen, leitfähigen Polymeren – den Polythiophenen.

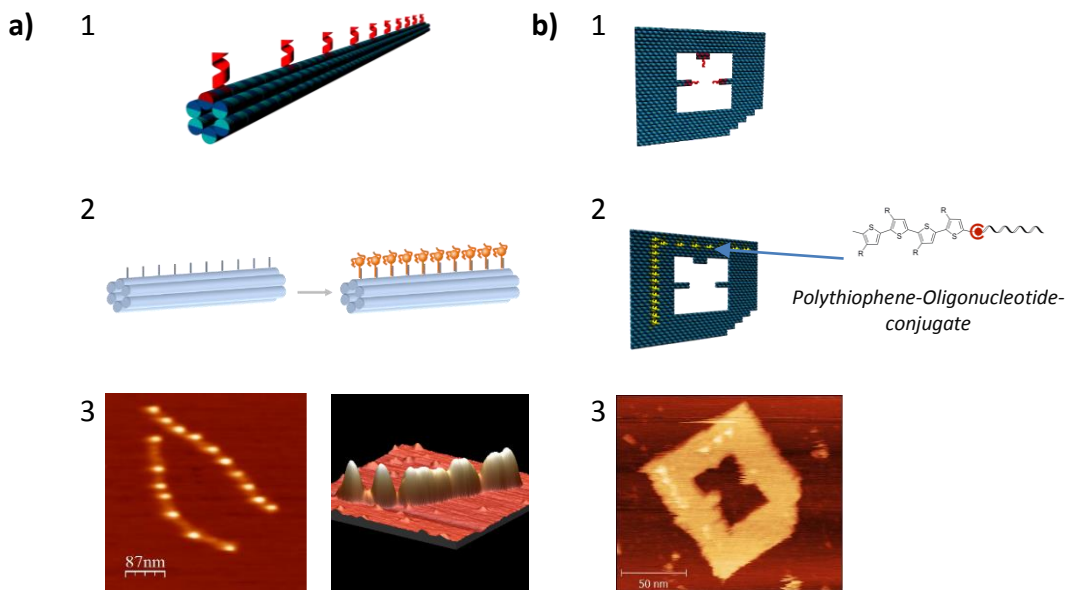


Abbildung 4: DNA-Origami als Template für die Funktionalisierung

In a1) ist der schematische Aufbau der 6HB mit den roten freien Bindestellen dargestellt. Sie werden mit z.B. den gelb hervorgehobenen Goldnanopartikeln funktionalisiert (a2). In a3) ist links eine AFM-Aufnahme eines mit Goldnanopartikeln funktionalisierten und auf Mica abgeschiedenen 6HB abgebildet, rechts daneben die zugehörige 3D-Abbildung. b) zeigt die zweidimensionale tPad®-Konstruktion. In a1) ist der tPad®-Rahmen mittig mit freien Bindestellen ausgestattet, sodass eine dreiarmlige Strebe eingebaut werden kann. In b2) sind analog des zweiten Ansatzes Polymere auf dem tPad®-Rahmen aufgebracht. Die AFM-Aufnahme (b3) bildet das Konstrukt mit den Polymeren ab. Die Abbildungen sind entnommen aus dem cfaed-Report des BAC-Pfades vom 25. März 2015 von Prof. Mertig.

Die vorliegende Arbeit untersucht die Grundlagen der Bindung an die Oberflächen und die Integration der nicht funktionalisierten DNA-Origami, damit sie zukünftig ihrer Funktion zugeführt werden können. Für die Template werden mithilfe der *Top-Down*-Verfahren kompatible Kavitäten geschaffen, sodass eine passgenaue Integration möglich ist. Die Strukturierung des Wafers mittels Nanoimprint-Lithographie wird im folgenden Kapitel thematisiert.

2.3 Nanoimprint-Lithographie

Miniaturisierte Bauelemente werden durch dreidimensionale Bearbeitung von Werkstoffen hergestellt. Dabei sind die Module mit verschiedenen Funktionen versehen. Die Mikrosystemtechnik nutzt neben dem oberflächennahen Bereich des Wafers (Substrat für elektronische und mikromechanische Bauelemente) zusätzlich dessen Tiefe (Gerlach & Dötzel,

2006). Durch einen speziellen Herstellungsprozess wird aus Quarz der Siliziumwafer hergestellt. Dieser Wafer muss strukturiert werden, um entsprechende DNA-kompatible Kavitäten herzustellen. Das Standardverfahren ist hierbei die Lithographie (*Top-Down-Verfahren*). Die Strukturübertragung erfolgt von einer Maske auf eine Lackschicht (Fotolack), welche wiederum als Maske der Strukturierung der darunterliegenden Schicht dient. Abhängig davon, ob die Lackschicht ein Positiv- oder Negativlack ist, entspricht die entstandene Struktur dem Muster der Maske oder ist komplementär (Abbildung 5). Der wichtigste Schritt bei Strukturübertragung ist die Belichtung, welche per elektromagnetischer Strahlung (UV, Licht) oder Partikelstrahlung (Ionen, Elektronen) umgesetzt werden kann. Für den Mikrometerbereich ist die Fotolithographie etabliert.

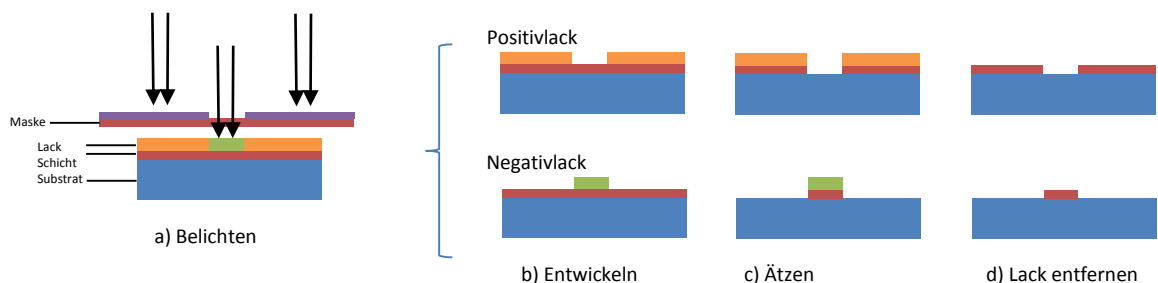


Abbildung 5: Strukturübertragung bei der Fotolithographie

Das Schema zeigt links den Schichtaufbau mit Maske und Belichtung, rechts die jeweiligen Schritte und Ergebnisse des Positiv- und Negativlacks (nach (Gerlach & Dötzel, 2006)).

Jedoch können mithilfe der Fotolithographie nur Strukturen bis $2\ \mu\text{m}$ in der Kontaktlithographie bzw. ca. $400\ \text{nm}$ in der Projektionslithographie realisiert werden. In Anbetracht der stetigen und rasanten Erhöhung der Integrationsdichten werden neue und alternative Methoden für die nanoskalige Strukturierung benötigt. Neue Strukturierungsansätze im Nanometerbereich sichern eine Integration der Nano-Objekte und die Verbindung zum *Bottom-Up*-Verfahren der DNA-Nanotechnologie.

Die Elektronenstrahl-Lithographie (*Electron Beam Lithography – eBeam*) ermöglicht die Strukturierung einer Elektronenstrahl-empfindlichen Schicht im Nanometerbereich (Abbildung 6). Die Belichtung erfolgt mit einem Elektronenstrahl, sodass der Lack chemisch modifiziert und lokal gelöst wird. Die Vorteile dieser Methode sind die hohe Auflösung, Dichte, Sensitivität und Zuverlässigkeit (Mohammad, 2012).

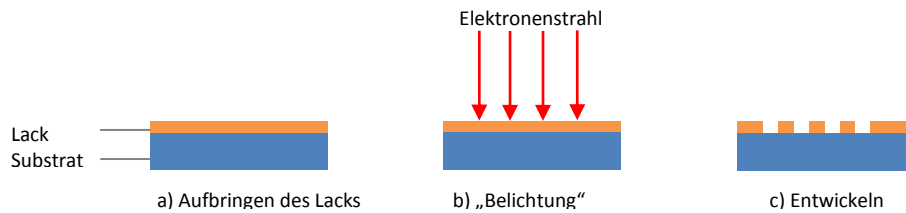


Abbildung 6: Schema Elektronenstrahl-Lithographie

Dargestellt ist das Schema der Elektronenstrahl-Lithographie, es zeigt den Auftrag des Lacks auf das Substrat, die folgende Strukturierung mittels eines Elektronenstrahls und die abschließende Entwicklung (nach (Gessner, 2007)).

Alternativen zur Fotolithographie und *eBeam* sind: *Soft Lithography* (Xia & Whitesides, 1998), „*Dip-Pen*“ Nanolithographie (Piner, Zhu, Xu, Hong, & Mirkin, 1999), AFM-Lithographie (Minne, 1995) und NIL (Guo, 2007).

Im Rahmen des cfaed-Clusters wird der Fokus auf die Strukturierung mittels NIL gelegt. Bei der NIL erfolgt keine Strukturierung mit Photonen/Elektronen/Ionen, sondern mithilfe mechanischer Deformation (Chou, Krauss, & Renstrom, 1995). Die Nanoimprint-Methode kann nicht nur Lacke bis unter 50 nm strukturieren, sondern auch Funktionsteile bzw. Bauteile in unterschiedlichste Polymere prägen (Guo, 2007). Diese Strukturen wiederum finden Anwendung in der Elektronik, Photonik, Biotechnologie und Datenspeicherung (Gou, 2004).

Das NIL-Prinzip ist in Abbildung 7 dargestellt. Ein Stempel mit einem nanoskaligen Oberflächenrelief wird unter definierten Bedingungen bezüglich Temperatur und Druck auf eine polymere Schicht eines Substrates gepresst und wieder abgelöst. In den strukturierten Bereichen bleibt eine dünne Schicht des Polymers übrig, welche mittels einer anisotropen Plasmaätzung entfernt wird, um die Strukturierung der Lackmaske zu vervollständigen.

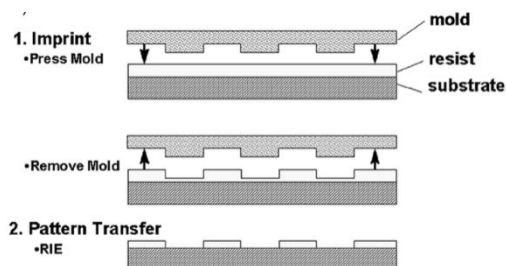


Abbildung 7: Schema des NIL-Prozesses

Zwei Schritte: 1. Imprint und 2. Strukturtransfer (entnommen aus (Guo, 2007)).

Danach folgt die eigentliche Oberflächenstrukturierung durch den Ätzprozess.

2.4 Interaktion zwischen DNA und Oberflächen

Bei der gezielten und selektiven Integration von DNA-Origami, wie auch bei der Assemblierung, spielen die Interaktionen zwischen DNA und der spezifischen Oberfläche die Hauptrolle. Diese Interaktionen resultieren aus der Struktur der DNA und den Oberflächeneigenschaften der Substrate.

Um DNA-Origami mittels AFM abzubilden, wird es standardmäßig auf Mica immobilisiert. Mica ist das präferierte Substrat für diesen Zweck, denn es besteht aus spaltbaren Aluminumsilikatschichten, wodurch im Labor eine atomar glatte und saubere Oberfläche hergestellt werden kann. Erfahrungsgemäß haftet DNA sehr gut auf Mica, wenn der Origami-Lösung Ionen – meist divalente Magnesiumionen – zugesetzt werden. Das Magnesium wird zur Stabilisierung bei der DNA-Origami-Synthese zugesetzt und überbrückt die negativen Ladungen, indem es als zweiwertiges Kation parallel eine Bindung zur negativen Hydroxylgruppe-Gruppe auf der Mica-Oberfläche sowie zum negativen Phosphatrückgrat der DNA aufbaut (Albrecht, et al., 2010). Das Optimum hinsichtlich der DNA-Origami-Bedeckung und Vermeidung von unerwünschten multiplen Bindungen in den Kavitäten liegt bei einem Magnesiumgehalt von 35 mM (Gopinath & Rothmund, 2014).

Jedoch ist dies eine sehr vereinfachte Annahme, denn Magnesiumionen allein stellen nur eine lose Bindung her (Woo & Rothmund, 2014). Jede Oberfläche und jede Lösung weist eine charakteristische Anordnung ihrer Ladungen auf. *Pillers et al.* gehen davon aus, dass ein optimales Bindeverhalten eintritt, wenn die DNA und Mica die gleiche Ladungsdichte haben (Pillers, Goss, & Lieberman, 2014). Des Weiteren hat die Ladungsdichte Einfluss auf die Selbstassemblierung von DNA-Origami (Sun, Ko, Zhang, Ribbe, & Mao, 2009) (Hamada & Murata, 2009). In einer Lösung kann DNA-Origami in der Form eines „potato chip[s]“ vorliegen (Kim, Kilchherr, Dietz, & Bathe, 2014) und sich dann flach auf die Oberfläche ablegen. Jedoch besteht auch die Möglichkeit, dass das Konstrukt auf der Oberfläche zerfällt, indem die Wasserstoffbrückenbindungen, beeinflusst durch die Ladungsdichte der Oberfläche, aufgelöst werden (Endo, Hidaka, & Sugiyama, 2011).

Zwischen Mica, den Magnesiumionen und den DNA-Origami entsteht eine ionische ungerichtete Bindung mit großer Reichweite. Die chemische Bindung ist ein physikalisch-chemisches Phänomen, durch das zwei oder mehrere Atome bzw. Ionen fest aneinander gebun-

den werden. Wenn Atome chemische Verbindungen eingehen, dann ändern sich ihre chemischen und physikalischen Eigenschaften. Mit dem Ziel die stabile Edelgaskonfiguration und damit die höchstmögliche Stabilität zu erreichen, findet ein Austausch von Elektronen statt. Somit basiert eine chemische Bindung auf einem Elektronenaustausch, den es bei den zur Verwendung kommenden Oberflächen zu beachten gilt.

Jedoch ist in der Halbleitertechnik Silizium das Grundmaterial. Durch gezielte Oxidation zu Siliziumdioxid und entsprechende Oberflächenmodifikation kann eine Mica-ähnliche Oberfläche realisiert werden, sodass eine präzise Immobilisierung der DNA-Origami möglich ist. Im Gegensatz zu Mica weist eine Siliziumdioxid-Oberfläche eine geringere Dichte von negativen Ladungen (Hydroxylgruppen) auf, die an der Luft entstehen. Demnach wird die Haftung der DNA-Origami auf der unbehandelten Siliziumdioxid-Oberfläche nicht ausreichend sein. Eine Möglichkeit besteht darin, Magnesium durch APTES (APTES = kationischer SAM (*self-organizing Monolayer*)) zu ersetzen (Pillers, Goss, & Lieberman, 2014). In dieser Arbeit wird der Fokus jedoch auf die Oberflächenmodifikation ohne SAMs gelegt. *Pillers et al.* als auch *Gopinath und Rothmund* stellten fest, dass die chemische Reinigung, die Aktivierung durch Sauerstoffplasma und Temperung (*thermal annealing*, Backen im Ofen) die Haftung der DNA-Origami positiv beeinflussen. Durch die genannten Modifikationen entstehen Silanolgruppen (S-OH) an der Siliziumdioxid-Oberfläche, die durch Deprotonierung eine anionische Ladung erhalten. Die spezifische Dichte der Silanolgruppen hängt stark von der Oberflächenbehandlung ab (Pillers, Goss, & Lieberman, 2014) (Gopinath & Rothmund, 2014). Den ionisierten Silanolgruppen kommt bei der magnesiumbasierten Anhaftung eine besondere Rolle zu, da an dieser Stelle die Magnesiumionen binden. In der vorliegenden Arbeit werden drei verschiedene Oberflächenmodifikationen der Siliziumdioxid-Oberfläche mittels Sauerstoffplasma hinsichtlich der Bindeintensität der DNA-Origami verglichen.

Zusätzlich ist die Intensität der Bindung zwischen einer Oberfläche und DNA-Origami bei einer spezifischen Kationstärke abhängig von dem eigentlichen Ion, von der Größe und Geometrie der DNA-Origami und der Methode der Substratpräparation (Gopinath & Rothmund, 2014). Bezogen auf einen Magnesiumgehalt von 12 mM binden 2D-Konstrukte stärker als lineare dsDNA mit derselben Nukleotidanzahl und größere und/oder flachere Objekte intensiver als kleinere/3D (Woo & Rothmund, 2014). *Woo und Rothmund* postulierten, dass ein Magnesiumgehalt von 12 mM unzureichend für den Immobilisierungs-

Puffer ist, da überwiegend lose Bindungen entstehen (Woo & Rothemund, 2014). Aus diesem Grund werden in dieser Arbeit die Stocklösungen im optimalen Immobilisierungs-Puffer nach *Gopinath und Rothemund* (TE-Puffer mit 35 mM Magnesiumchlorid) verdünnt. Neben der Dichte der Hydroxylgruppen, dem Magnesiumgehalt und der Form der DNA-Origami beeinflussen pH-Wert, die Oberflächenbehandlung des Substrates, die Hydrophobizität und die Rauigkeit des Substrates die Immobilisierung auf der Oberfläche. Bezogen auf Siliziumdioxid führt eine Erhöhung des pH-Wertes zur Erhöhung der Dichte der negativen Ladungen, da die Hydroxylgruppen im basischen Bereich zum Deprotonieren neigen (Albrecht, et al., 2010). Weiterhin wird davon ausgegangen, dass DNA-Origami hauptsächlich auf hydrophilen und nicht ausreichend an neutralen und hydrophoben Oberflächen, z. B. Graphen, binden (Alloyeau, Ding, Ramasse, & Kisielowski, 2011). Andererseits erhöhen divalente Kationen die DNA-Bindung an PMMA (Polymethylmethacrylat) – ein hydrophobes Polymer (Melander & Horvath, 1977). Außerdem wurde festgestellt, dass ein extrem niedriger pH-Wert eine starke, unspezifische Bindung auch auf hydrophoben Oberflächen induziert und ein extrem hoher pH-Wert hingegen eine schwache Bindung und gestreckte Moleküle verursacht (Allemand, Bensimon, Jullien, & Croquette, 1997). *Allemand et al.* beschreiben die Interaktion im pH-Bereich < 1 zwischen DNA und PMMA folgendermaßen: durch die Protonierung der Nukleobasen wird die DNA aufgeschmolzen und der hydrophobe Teil der DNA freigelegt, sodass eine erhöhte Bindeaffinität auf hygroskopischen (Luftfeuchtigkeit aufnehmend) Oberflächen zu beobachten ist. Die beschriebenen Interaktionen legen den Grundstein für aktuelle und geplante Integrationstechniken für DNA-Origami.

2.5 Konzepte für die gezielte Immobilisierung von DNA-Origami

Die Interaktionen zwischen DNA bzw. DNA-Origami und den in 2.4 erwähnten Oberflächen stellen die Grundlagen für die entwickelten Technologien zur selektiven Immobilisierung von DNA-Origami dar. Etablierte Immobilisierungsverfahren von *Kershner et al.* (Kershner, 2009) und *Gopinath et al.* (Gopinath & Rothemund, 2014) in nano- und mikrostrukturierten Oberflächen basieren auf der mikrotechnischen Erzeugung von hydrophilen Bereichen,

welche die Form der DNA-Origami aufweisen. Durch den Polaritätsunterschied ist es möglich, die Immobilisierung der DNA hinsichtlich Position und Orientierung zu steuern (Abbildung 8). *Kershner et al.* nutzten eine Siliziumdioxidschicht als Substrat und brachten vor dem Lack einen hydrophoben, DNA-Origami abweisenden *Template layer* auf. Als *Template layer* fungieren eine TMS-Monoschicht (Tetramethylsilan), ein DLC-Film (Diamond-Like Carbon) (Kershner, 2009) oder eine HMDS-Schicht (Hexamethyldisilazan) (Gopinath & Rothmund, 2014). TMS/HMDS dienen in der standardisierten Lithographie als Haftvermittler für den aufzubringenden Lack. Die Methylgruppe von TMS/HMDS verbindet sich mit der Siliziumdioxid-Oberfläche und bildet eine hydrophobe, DNA-Origami abweisende Schicht aus. Der DLC-Film wurde nicht durchstrukturiert, sondern nur ein Höhenunterschied geschaffen. Die Strukturierung des Lacks erfolgte mit *eBeam*, sodass in den hydrophilen Bereichen der *Template layer* zurück bleibt. Dieser wird durch das Sauerstoffplasma entfernt und es entstehen durch Ionisierung der darunter liegenden Silanole (SiOH-Gruppen) negativ geladene Hydroxylgruppen. Die Hydroxylgruppen führen zu einer negativeren Ladungsdichte und beeinflussen mit Magnesium das Bindeverhalten der DNA-Origami. Der Lack wird entfernt, die Strukturierung ist abgeschlossen und die Origami können selektiv und genau immobilisiert werden.

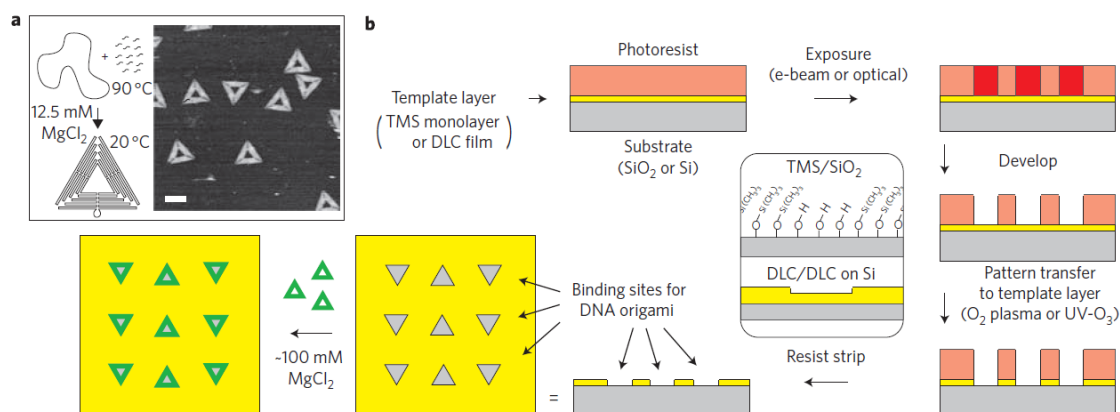


Abbildung 8: Immobilisierung der DNA-Origami nach Kershner et al.

In a) sind die Selbstassemblierung der DNA-Origami und die Dreiecke als AFM-Aufnahme dargestellt. b) beschreibt den Vorgang von Strukturierung und Aktivierung der DLC/SiO₂-Oberfläche bis hin zur Immobilisierung der DNA-Origami (entnommen aus (Kershner, 2009)).

Gopinath und Rothmund reproduzierten, erweiterten und verbesserten den vorgestellten Versuchsaufbau mit dem Ziel dreieckige DNA-Origami präzise auf Siliziumdioxid-Oberflä-

chen zu immobilisieren. Sie setzten zusätzlich NIL als Strukturierungsmethode ein und erreichten die Kavitäten-bezogene Bindung nicht nur durch ionisierte Silanole (SiOH -Gruppen) und Magnesiumionen, sondern auch durch SAMs und kovalente Bindungen (Abbildung 9). Des Weiteren beschrieben sie eine Reihe von Parametern, die einen Einfluss auf die gezielte und präzise Immobilisierung von DNA-Origami haben. Sie berichten z.B. davon, dass eine Origamikonzentration über 110 pM für unerwünschte multiple Bindungen sorgt, die ideale Inkubationszeit eine Stunde beträgt und der optimale Immobilisierungs-Puffer einen pH-Wert von 8,4 und eine Magnesiumkonzentration von 35 mM aufweist.

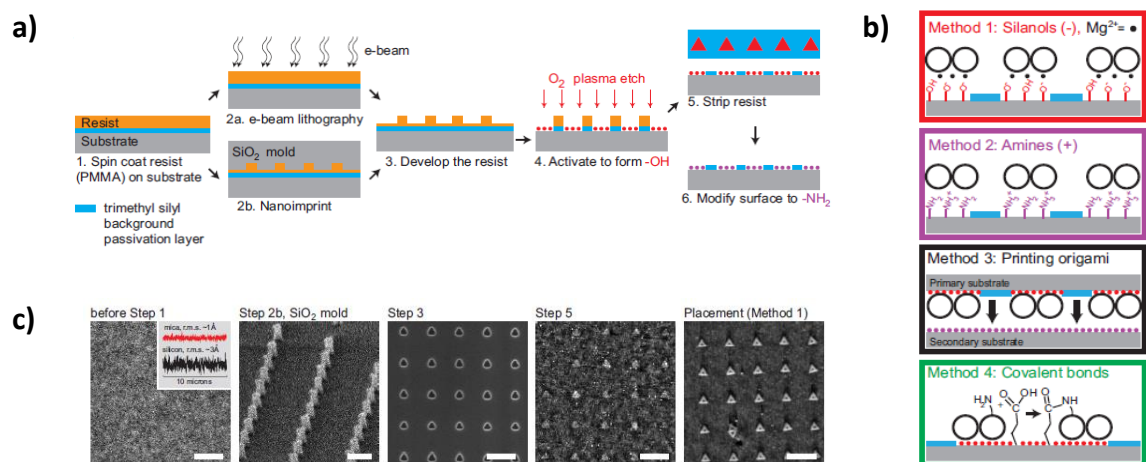


Abbildung 9: Immobilisierung der DNA-Origami nach Gopinath/Rothemund

Schema der a) Strukturierung, b) Herstellung der Bindung und c) AFM-Aufnahmen der unbearbeiteten SiO_2 -Oberfläche, des NIL-Stempels, der strukturierten Oberfläche, nach Ablösen des Lacks und letztlich die erfolgte Immobilisierung (entnommen aus (Gopinath & Rothemund, 2014)).

Die beschriebenen Integrationsansätze und deren Mechanismen bilden die Grundlage für die folgenden Immobilisierungsmöglichkeiten.

2.5.1 Verstärkung des Polaritätsunterschiedes

In dieser Arbeit wird ein Immobilisierungsansatz untersucht, der sich durch eine zusätzliche hydrophobe und damit DNA-Origami-abweisende Schicht auszeichnet. Dieser Aufbau sieht eine zukünftige mikrofluidische Umsetzung der Immobilisierung der DNA-Origami auf einem 6-Inch-Wafer vor, um eine großskalige Umsetzung zu realisieren. Das Konzept von Helke *et al.* beschreibt den Substrataufbau folgendermaßen: der Siliziumwafer wird mit einer hydrophilen Siliziumdioxid-Schicht durch thermische Oxidation versehen, danach folgt die Aufbringung einer hydrophoben Schicht DLC oder CF, um die DNA-Origami in diesen Bereichen von der Bindung abzuhalten (Abbildung 10). Die Strukturierung dieses Wafers

soll mittels Nanoimprint-Lithographie (NIL) am ZfM/ENAS erfolgen. Der Versuchsaufbau sieht die Herstellung eines Silizium-Masters mithilfe der Elektronenstrahl-Lithographie (*e-Beam*) vor. Von diesem Master werden NIL-Stempel abgeformt, welche aus Glas und einem Polymer bestehen. Diese Arbeitsstempel werden im Anschluss in den neuartigen Prototypen-2-Schicht-Lack geprintet, der sich auf dem zu strukturierenden Silizium-Wafer befindet. Dieser Prototyp besteht aus zwei Schichten – dem dünnen Imprintlack und dem dicken Transferlack. Im Prozessverlauf wird der Arbeitsstempel entformt und der Lack in zwei Stufen bis zum Substrat selektiv geöffnet. Anschließend wird das Substrat über die Lackmaske strukturiert und die hydrophobe Schicht über die Masken geätzt. Nach erfolgter Strukturierung wird die Maske entfernt.



Abbildung 10: Substrataufbau des 6-Inch-Wafers

Die Grafiken zeigen in a) den Schichtaufbau des Substrates in drei Schritten und in b) die anschließende Immobilisierung von DNA-Origami (entnommen aus (Helke, et al., 2014)).

Auf diesem Wege entstehen die hydrophilen Kavitäten für die Integration der DNA-Origami mit den kompatiblen Abmaßen und eine hydrophobe Zusatzschicht, welche die DNA-Origami von der Bindung abhalten soll. Die Herstellung der Bindung zwischen den hydrophilen Bereichen und DNA-Origami findet in dieser Arbeit ausschließlich Magnesium basiert statt.

2.5.2 Molekularer *Lift-off*

Eine weitere Integrationsmöglichkeit stellt ein *Lift-off* dar. Der *Lift-off*-Prozess (Abhebe-technik) ist eine weitere Möglichkeit der Schichtstrukturierung. Hierbei handelt es sich um eine Haftmaskentechnik. Dabei wird auf dem Substrat eine Maske hergestellt, die aus strukturiertem Lack besteht. Diese Maske wird ganzflächig auf der zuletzt aufgetragenen Schicht des Wafers hergestellt. Sie wird selektiv strukturiert, eine weitere Schicht aufgetragen und im Anschluss die Maske entfernt – der eigentliche *Lift-off* (Gerlach & Dötzel,

2006). Die folgende Abbildung 11 zeigt einen Versuchsaufbau zur Immobilisierung von DNA-Origami mit SAM-Deposition und anschließendem *Lift-off*.

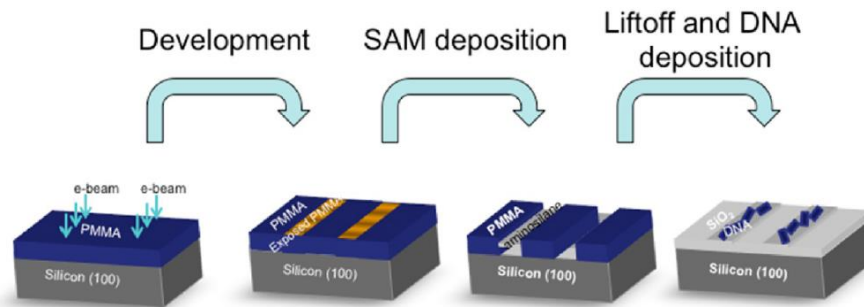


Abbildung 11: Lift-off nach Pillers et al.

Die Abbildung stellt den praktizierten Versuchsaufbau inklusive Lift-off dar. Auf einem Siliziumwafer wird PMMA aufgetragen und strukturiert mittels eBeam. Es folgt die Positionierung von SAMs (self-assembling monolayers), der Lift-off und anschließend die Immobilisierung der DNA-Origami (entnommen aus (Pillers, Goss, & Lieberman, 2014)).

Dieser Ansatz schafft den Anreiz für einen molekularen *Lift-off* (Abbildung 12). Hinter diesem Begriff verbirgt sich die Idee eines biokompatiblen *Lift-offs* – die Entfernung des Lacks nach der DNA-Origami-Immobilisierung. DNA-Origami ist unter folgenden Bedingungen formstabil: 10 minütige Hitzeeinwirkung bis 200°C, bis zu 24 h Eintauchen in einer Vielzahl von organischen Lösungsmitteln wie zum Beispiel Ethanol und Hexan, kurze Exposition gegenüber alkalischen wässrigen Lösungen bis zu einem pH-Wert von 11 und 5 min UV/O₃ (Kim, Surwade, Powell, O'Donnell, & Liu, 2014). Diese Ergebnisse und damit einhergehende Stabilität der in dieser Publikation verwendeten DNA-Origami deuten darauf hin, dass der Ansatz des molekularen *Lift-offs* umsetzbar ist.

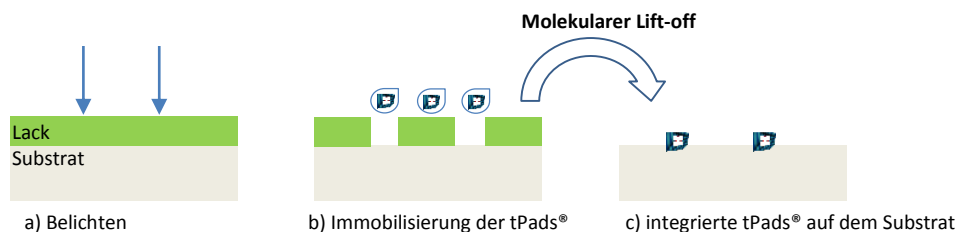


Abbildung 12: Molekularer Lift-off

Die Abbildung zeigt den Ansatz des molekularen Lift-offs. a) Das Substrat mit aufgebrachtem Lack wird belichtet, also strukturiert, b) die tPads® immobilisiert und c) anschließend wird mittels Lift-off der Lack inkl. unspezifische Bindungen entfernt, sodass die tPads® nicht angegriffen werden.

Diese Technik könnte neue Integrationsmöglichkeiten und -verfahren ohne Berücksichtigung der Hydrophobizität und der unspezifischen Anhaftung etablieren.

2.5.3 Elektrostatische Felder

Ein weiterer Ansatz zur Immobilisierung der DNA-Origami basiert auf der Methode der Nanoxerographie (Abbildung 13). Für die Herstellung von Strukturen im Nanometerbereich und das präzise Platzieren von Nano-Objekten scheinen elektrostatische Felder vielversprechend zu sein, da sie eine weitreichende Wirkung haben. Sie erlauben die parallele Anziehung vieler Nano-Objekte auf eine gewünschte Stellung hin. Die Nanoxerographie setzt elektrostatische Felder lokal ein, um Partikel und Moleküle, welche in unpolaren Lösungsmitteln dispergiert sind, gezielt auf Oberflächen anzuordnen. Zu diesem Zweck werden Muster lokaler Oberflächenladungen in Oberflächen geschrieben, indem eine Spannung zwischen einer leitfähigen AFM-Spitze und der Probe angelegt wird. Die negativ geladene Oberfläche zieht bei der darauf folgenden Benetzung die polaren Partikel an.

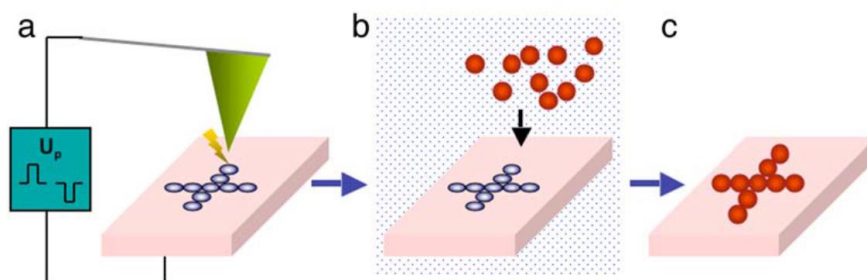


Abbildung 13: Schema der Nanoxerographie

Dargestellt ist das Schema der Nanoxerographie. a) Mittels einer leitfähigen AFM-Spitze wird im contact mode eine Ladung in das Substrat geschrieben, b) die Probe wird in eine Suspension der Nano-Objekte getaucht, c) gespült, getrocknet und weist nach dem Prozess eine selektive Anlagerung der Objekte in den vorher definierten Bereichen auf (entnommen aus (Stemmer, 2008).

Selbst die Positionierung von Biomolekülen – wie Fibrillen, Biotin und Antikörpern (Mesquida, Blanco, & McKendry, 2006) (Blanco, Nesbitt, Horton, & Mesquida, 2007) – ist möglich. Hierbei liegt ein unpolares Molekül vor, sodass ein nicht leitfähiges Lösungsmittel benötigt wird, welches nicht in Interaktion mit der geladenen Oberfläche tritt.

Die Biomoleküle werden in einer Wasser-in-Öl-Mischung mittels Ultraschall emulgiert und das elektrostatisch aufgeladene Substrat in die Emulsion eingetaucht, sodass eine präzise Anlagerung an das Substrat bzw. die vorher mit einer negativen Ladung beschriebene Stelle

erfolgen kann (Mesquida & Blanco, 2010). Die Partikel, die sich bevorzugt in der wässrigen Phase befinden, werden nun über die Anziehung der Wassertropfen innerhalb der Emulsion an die zuvor geladene Oberfläche angezogen. Das Wasser verdunstet und die Nano-Objekte werden durch die Wechselwirkungen an der Oberfläche gebunden (Stemmer, 2008). In Abbildung 14 ist das Verfahren namens EDL (*Electric-Droplet Lithography*) dargestellt. Es wurde entwickelt durch E. M. Blanco, S. Nesbitt, M. Horton und P. Masquida.

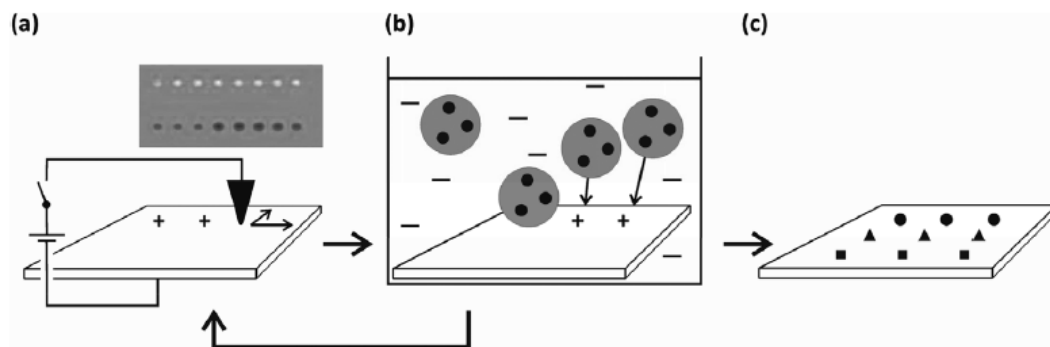


Abbildung 14: EDL: Eine Kombination aus Nanoxerographie und Microdroplets

Das Schema bildet den EDL-Prozess ab. a) Mittels Contact Mode und einer leitfähigen Spitze, an die eine Spannung angelegt ist, werden Ladungen in das Substrat geschrieben. b) Deposition der emulgierten Microdroplets (enthalten das zu positionierende Material) durch Eintauchen des Substrates. c) Positionierte Nanopartikel (entnommen aus (Mesquida & Blanco, 2010)).

Der Vorteil dieser Methode besteht in der Unabhängigkeit der zahlreichen Parameter, welche die Immobilisierung der DNA-Origami beeinflussen – z.B. pH-Wert und Magnesiumkonzentration. Die Anlagerung der Moleküle basiert hauptsächlich auf der Anziehung von Wasser an die negative Ladung (Van-der-Waals-Wechselwirkungen). Nach diesem Schema sollte die Konzentration der Nano-Objekte, das Oberflächenpotential und die Inkubationszeit eine Rolle spielen.

Die Versuche werden auf PMMA (Polymethylmethacrylat gespincoatet auf Siliziumdioxid) durchgeführt, da diese Oberflächen für ihre gute Ladungsspeicherung bekannt sind und dadurch in der Nanoxerographie als gängige nicht-leitfähige Schicht eingesetzt werden. Die Lösung der Biomoleküle wird in Fluorinert mittels Ultraschallbad emulgiert. Durch das Ultraschallbad werden kleinste Wassertropfchen in Fluorinert gebildet, welche die Biomoleküle enthalten. Eine Emulsion ist ein Gemisch zweier eigentlich nicht-mischbarer Flüssigkeiten. Die disperse oder innere Phase liegt in kleinen Tröpfchen verteilt in einer Flüssigkeit vor. Die Phase mit dem größeren Volumen wird kontinuierliche oder äußere

Phase genannt. Emulsionen gehören somit zu den dispersen Systemen. Je nachdem, welche Phase die Tröpfchen bildet, handelt es sich um eine Wasser-in-Öl-Emulsion oder eine Öl-in-Wasser-Emulsion. Das Problem besteht darin, dass die Konzentration der Nano-Objekte, respektive die der Biomoleküle, eine hohe Konzentration aufweisen müssen. Aus diesem Grund werden erste Experimente mit Lachsspermien-DNA stattfinden, die in einer höheren Ausgangskonzentration von 0,22 mM (10 mg/ml) vorliegt im Gegensatz zu 30 nM DNA-Origami.

3 Material und Methoden

Das folgende Kapitel erläutert das Material und die Methoden für die Immobilisierung von DNA/DNA-Origami. Alle Versuche wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

3.1 Material

In diesem Unterkapitel werden die verwendeten Substrate, die biologischen Proben, Chemikalien und Geräte beschrieben, welche bei der Immobilisierung der DNA/DNA-Origami benutzt wurden.

3.1.1 Substrate

Es wurden folgende Trägermaterialien für die Immobilisierung von DNA und DNA-Origami verwendet:

Mica: spaltbares Aluminiumsilikat mit atomar glatter Oberfläche, V1 Highest Grade (Plano GmbH).

Siliziumdioxidwafer: 6 Inch Wafer, thermisch gewachsenes Siliziumdioxid in einer Dicke von ca. 300 nm – Beschichtung mit 25 nm DLC; 50 nm CF, HMDS (hergestellt ZfM/ENAS).

3.1.2 Biologische Proben

Lachsspermien-DNA

Die Lachsspermien-DNA wird von Sigma-Aldrich Chemie GmbH bezogen und weist eine Konzentration von 10 mg/ml gelöst in Wasser auf. Die DNA liegt einzelsträngig vor und ist ca. 700 bp lang. Die DNA wird zu je 10 µl aliquotiert und bei -20°C eingefroren, zu Versuchsbeginn eine Stunde bei Raumtemperatur aufgetaut, unter der Sterilbank in TE-Puffer (5 mM Tris, 35 mM MgCl₂, pH 8,35) beziehungsweise TAE-Puffer (40 mM Trizma Base, 20 mM Essigsäure, 2 mM EDTA, 12,5 mM Magnesiumacetat, pH 8 bis 8,3) gelöst, sodass folgende

Konzentrationen vorliegen: 100 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$, 1 $\mu\text{g/ml}$ und 0,5 $\mu\text{g/ml}$. Anschließend werden diese über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt, damit die Einzelstränge hybridisieren können.

tPads®

Die 100 x 100 nm² großen tPads® (Abbildung 15) werden an der TU Dresden durch Nachwuchsforschergruppe MindNano an der Professur für Physikalische Chemie, Mess- und Sensortechnik von Prof. M. Mertig hergestellt. Sie bestehen aus dem *scaffold strand* M13mp18 und 253 *staple strands* und liegen in einer Konzentration von 30 nM in TE (12,5 mM MgCl₂, 40 mM Tris, 2 mM EDTA, pH 8,1) vor. Die Aufbewahrung erfolgt im Kühlschrank. Unter der Sterilbank wird eine Konzentration von 3 nM in TE-Puffer (5 mM Tris, 35 mM MgCl₂, pH 8,35) gelöst hergestellt, sodass 32,75 mM MgCl₂ bei Raumtemperatur vorliegen.

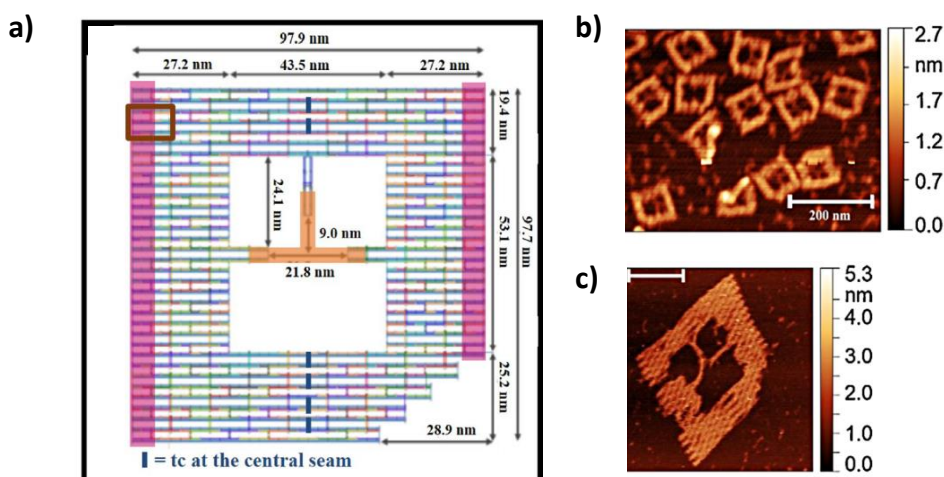


Abbildung 15: tPad®-Design und AFM-Aufnahmen

a) Schema des ca. 100 x 100 nm² großen tPads® mit hervorgehobenen, pinkfarbenen end staple strands, den zentralen Kreuzungen (blau) und einer Darstellung der dreiarmligen Strebe (orange), b) AFM-Aufnahme mit einzelsträngigen Enden und c) einzelnes tPad®, Skala: 50 nm (Fischer, Henning-Knechtel, & Mertig, 2015).

Pads

Die 150 x 40 nm² großen Pads werden ebenfalls an der TU Dresden synthetisiert. Die benutzte Charge stammt von Dr. Andreas Heerwig. Die Pads bestehen aus 16 Helices (Abbildung 16) und liegen in einer Konzentration von 33 nM in TE (12,5 mM MgCl₂, 40 mM Tris, 2 mM EDTA, pH 8,1) vor. Die Verdünnung wird analog der der tPads® hergestellt.

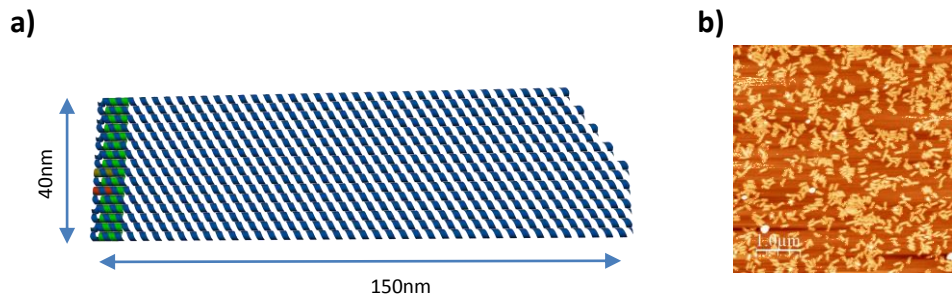


Abbildung 16: Pad-Design und AFM-Aufnahme

a) Schema des Pads bestehend aus 16 Helices mit den Maßen $40 \times 150 \text{ nm}^2$, b) AFM-Aufnahme der Pads auf Mica (von Dr. Andreas Heerwig).

Six Helix Bundles

Die Six-Helix-Bundles bestehen aus sechs Helices und ihre Abmessungen sind 400 nm Länge und 6 nm Durchmesser (Abbildung 17). Auch diese Strukturen werden an der TU Dresden von Dr. Andreas Heerwig hergestellt. Sie liegen in gleicher Konzentration und im selben Puffer vor wie die Pads. Die Verdünnung wird analog der der tPads® hergestellt.

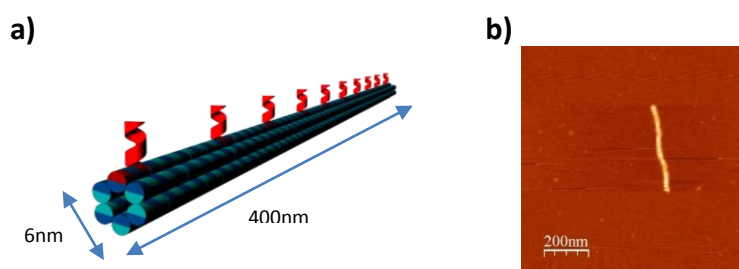


Abbildung 17: 6HB-Design und AFM-Aufnahme

a) Schema des 6HB bestehend aus 6 Helices mit den Maßen $400 \times 6 \text{ nm}^2$, b) AFM-Aufnahme eines einzelnen Bundles auf Mica (von Dr. Andreas Heerwig).

3.1.3 Chemikalien und Geräte

Die Liste für die verwendeten Chemikalien, Geräte und Software ist im Anhang zu finden.

3.2 Methoden

Der Methodenteil dieser Arbeit umfasst die Oberflächenmodifikation, die Nanoxerographie, die Probenpräparation und abschließend die analytischen Methoden zur Auswertung der hergestellten Proben.

3.2.1 Oberflächenmodifikation

Die Siliziumwafer liegen als Grundsubstrat (Eigenproduktion) vor. Die Wafer werden gesägt, gereinigt (DI-Spülung und trocknen) und mittels Sauerstoff-Plasma aktiviert. Die Aktivierung findet mittels dreier verschiedener Methoden statt, um die Immobilisierung der DNA-Origami zu charakterisieren. Es werden folgende Parametersätze genutzt:

1: 1 min, 200 Watt (2,45 GHz), 450 sccm O₂, ca. 1 mbar

2: 5 min, 800 Watt (2,45 GHz), 450 sccm O₂, ca. 1 mbar

3: 5 min; 100 Watt (13,56 MHz), 50 sccm O₂, 10 Pa

3.2.2 Nanoxerographie

An die AFM-Stage wird eine Spannung von +20V mit dem Agilent E3631A angelegt und mittels des CM (*Contact Mode* – Kontaktmodus des AFM) ein 15 x 15 µm² großes Feld negativ elektrostatisch aufgeladen. Das Verfahren wird „*Charge Writing*“ genannt. Die Messung des Potentialunterschiedes der entsprechenden Oberfläche erfolgt mit KPFM (*kelvin-probe force microscopy*). Für beide Methoden werden folgende Spitzen verwendet: Mikro-masch HQ:NSC18/Pt, 75 kHz, 2,8 Nm. Im Anschluss an die Messung wird die Probe in eine Öl-in-Wasser-Emulsion getaucht.

3.2.3 Probenpräparation

Untersuchung der DNA-Immobilisierung

Das Mica-Plättchen wird gespalten, an der Rückseite markiert und auf fusselfreiem Papier in eine Petrischale überführt. Mica wird mit 200 µl TAE/TE-Puffer für 1 min bei Raumtemperatur funktionalisiert und dreimal mit 1 ml millipore-Wasser gespült, anschließend luft-

getrocknet. Dann werden 5 μ l DNA-Lösung auf die Positivkontrolle aufgetragen (Negativkontrolle nur Puffer) und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgt ein weiterer Spülschritt von der Negativkontrolle hin zur Positivkontrolle mit je zweimal 400 μ l millipore-Wasser bzw. 70%-igem Ethanol und die anschließende Lufttrocknung. Mit dem Ziel der Etablierung einer AFM-alternativen Methode werden die Präparate für die Fluoreszenzauswertung mit YOYO-1 angefärbt. Das anfangs gewählte Verhältnis beträgt sieben Basenpaare pro YOYO-1-Molekül für 100 μ g/ml Lachsspermien-DNA. Die Färbelösung wird für alle DNA-Konzentrationen verwendet. 10 μ l einer 20 μ M YOYO-1-Lösung in TE/TAE-Puffer werden jeweils auf die Positivkontrolle und die Negativkontrolle pipettiert. YOYO-1 wird zwei bis drei Minuten lichtgeschützt bei Raumtemperatur inkubiert und dreimal mit 1ml Puffer gespült.

Für nachfolgende Untersuchungen wird mit einem Verhältnis von 12,5 Basenpaaren pro YOYO-1-Molekül (Fürstenberg, et al., 2006) gearbeitet und für jede DNA-Konzentration die äquivalente Farbstoffkonzentration verwendet. Die Verdünnung findet in salzfreiem Puffer statt, da Salze die Fluoreszenzintensität von YOYO-1 schwächen (Marie, Vaultot, & Partensky, 1996).

Immobilisierung von DNA-Origami

Die ca. 30 nM ungefilterte Stocklösung wird kurz gevortext und dann unter der Sterilbank in TE-Puffer verdünnt (LoBind-Tubes Eppendorf), sodass eine 3 nM Konzentration mit einem Magnesiumgehalt von 32,75 mM entsteht. Die verdünnte Lösung wird kurz gevortext und 3-5 μ l davon auf das Substrat aufgetragen. Die Inkubationszeit beträgt 10 min. Die Lösung wird mit einem fusselfreien Tuch abgezogen und anschließend mit 200-300 μ l millipore-Wasser gespült. Daraufhin wird die Probe mit einem Stickstoffstrahl getrocknet. Die Immobilisierung auf den Plasma-aktivierten Siliziumdioxidoberflächen muss zeitnah (15-30 min) erfolgen, da die Aktivierung nur begrenzt haltbar ist.

Molekularer Lift-off

Der molekulare Lift-off findet auf Mica statt. Die Präparation der tPads® erfolgt analog des letzten Abschnittes „Immobilisierung von DNA-Origami“. Im Anschluss an die Immobilisierung wird die Probe mit 200-300 μ l 2% Natriumhydroxid-Lösung (NaOH, pH 13) gespült.

Weitere Proben werden mit Aceton, Isopropanol und DI-Wasser unter mechanischer Einwirkung gespült. Zum Vergleich wird der Spülvorgang mit 10 sec Eintauchen für alle Detergenzien wiederholt.

Nanoxerographie

Erste Versuche finden aufgrund umfangreicher Erfahrungen innerhalb der Arbeitsgruppe mit PMMA auf Silizium statt. 0,3 ml einer 10 mg/ml-Konzentration Lachsperrn-DNA wird in 0,4 ml Fluorinert FC-770 (Sigma-Aldrich GmbH) mittels 5-minütigem Ultraschallbad (VWR Ultrasonic Cleaner) emulgiert.

3.2.4 Analytische Methoden

Fluoreszenzmikroskopie

Die Fluoreszenzmikroskopie ist eine Methode der allgemeinen Lichtmikroskopie. Die Objekte werden dazu mit Fluoreszenzfarbstoffen spezifisch markiert. Diese lassen sich mit Licht einer bestimmten Wellenlänge anregen und emittieren Licht mit einer größeren Wellenlänge. Die verschiedenen Wellenlängen lassen sich über Filter und Strahlenteiler voneinander separieren. Eine Kamera (Olympus DD71) erlaubt die Aufnahme digitaler Bilder, die dann entsprechend bearbeitet werden können. Bei dem genutzten Mikroskop handelt es sich um ein Olympus IX 51 (optisches Inversmikroskop ausgestattet mit Hg-Dampflampe zur Anregung) mit Blaufilter (Olympus U-MWGS3). Der verwendete Farbstoff ist der Bis-Interkalator YOYO-1 (1 mM in DMSO, Lifetechnologies GmbH, Strukturformel siehe Abbildung 18a). Dieser zeichnet sich durch eine deutliche Fluoreszenzverstärkung nach Bindung an dsDNA (Abbildung 18b) und gesundheitliche Unbedenklichkeit aus.

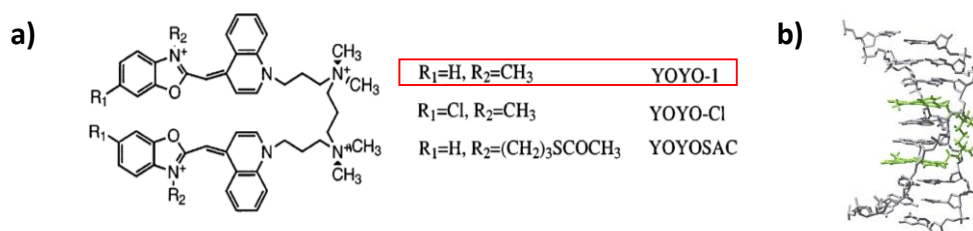


Abbildung 18: Strukturformel des Fluoreszenzfarbstoffes YOYO-1 und Interkalation in dsDNA

In a) ist das YOYO-1-Molekül dargestellt (entnommen aus (Fürstenberg, et al., 2006)) und in b) der Einbau des planaren, grün dargestellten YOYO-1-Moleküls zwischen zwei gestapelten Basen im grauen DNA-Doppelstrang (entnommen von (Invitrogen Life Science, kein Datum).

Die Interkalation ist eine spezielle Bindungsform, bei der ein Liganden-Molekül zwischen zwei gestapelte Basen eingeschoben wird. Währenddessen interagieren die aromatischen Ringe der Farbstoffmoleküle mit den heteroaromatischen Ringen der Basen der DNA (Benke, 2007). Die Wellenlänge der maximalen Absorption beträgt 491 nm; das Intensitätsmaximum des emittierten Fluoreszenzlichtes liegt bei einer Wellenlänge von 509 nm. Freier, ungebundener Farbstoff fluoresziert mit wesentlich geringerer Intensität.

AFM

Die Rasterkraftmikroskopie (*atomic force microscopy*) ist ein Verfahren zur Abbildung und Vermessung topographischer Oberflächenstrukturen. Der schematische Aufbau ist in Abbildung 19 dargestellt.

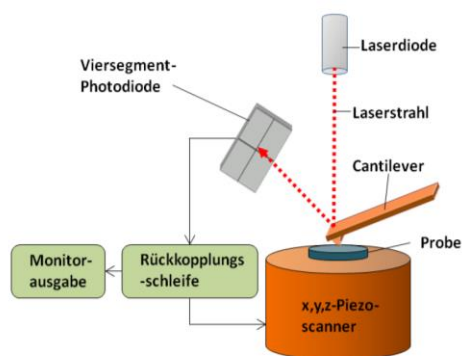


Abbildung 19: Schematischer Aufbau des AFM

Die Oberflächentopographie wird von einer am Cantilever befestigten Spitze abgerastert. Die atomaren Wechselwirkungen zwischen Oberfläche und Spitze lenken den Cantilever ab (Henning, 2012).

Ein Piezoaktuator steuert und führt eine feine Spitze rasterförmig über die Probe. Die Spitze ist an einem Federbalken montiert, welcher als Hebelarm (*Cantilever*) dient. Ein Laserstrahl trifft auf den Federbalken und wird auf eine positionsempfindliche 4-Segmentdiode reflektiert. So wird die Verbiegung des *Cantilever* und die damit wirkende Kraft registriert, die abhängig von der Proben-topographie ist. Die Regelgrößen werden von einem Messrechner in ein dreidimensionales Höhenbild umgesetzt. Das Rasterkraftmikroskop kann in verschiedenen Modi betrieben werden: Kontaktmodus (CM – *Contact Mode*), Nicht-Kontaktmodus (*Non-Contact Mode*) und intermittierender Modus (IC – *Intermittend Contact Mode* oder TM – *Tapping Mode*). Im Rahmen dieser Arbeit wird für die Abbildung der DNA-Strukturen

der TM verwendet. Hierbei schwingt der *Cantilever* nahe seiner Resonanzfrequenz. Wechselwirkungskräfte zwischen der Spitze des Federbalkens und der Probenoberfläche verändern die Resonanzfrequenz des Systems, wodurch sich die Schwingungsamplitude und die Phase ändern. Die Schwingungsamplitude wird als Regelsignal beim Abrastern der Probe genutzt. Dieser Regelkreis versucht die Amplitude konstant zu halten, indem der Abstand zwischen Spitze und Probe angepasst wird. Die Spitze fährt somit mit konstanter Schwingungsamplitude über die Probe, sodass die Adhäsionskräfte überwunden werden können und die Spitze nur im Bereich des Umkehrpunktes der Schwingung in Kontakt mit der Oberfläche tritt. Es kommt zu fast keiner Verschiebung oder Beschädigung der Moleküle auf der Substratoberfläche, sodass der TM sehr gut geeignet ist, um DNA-Moleküle abzubilden (Hansma, et al., 2000).

Die rasterkraftmikroskopischen Aufnahmen in Luft erfolgen bei Raumtemperatur mit einem Digital Instruments Dimension 3000, Model: 3000-1-PAL, serial: #462EX bzw. Agilent Technologies 5600LS AFM und den Standard-Spitzen PPP-NCHR-50 (PointProbe® Plus Non-Contact / Tapping Mode – High Resonance Frequency – Reflex Coating) von Nanosensors; die anschließende Bearbeitung der Aufnahmen mit Gwyddion 2.42 beziehungsweise NanoScope III Analysis V531r1.

KPFM

KPFM (*kelvin-probe force microscopy*) ist ein erweiterter Messmodus des AFM, der neben der Oberflächentopographie auch das Oberflächenpotential detektiert. Dieser Modus basiert auf einem historischen Versuchsaufbau. Lord Kelvin entdeckte einen Stromfluss zwischen zwei verschiedenen, parallel angeordneten Metallplatten, die in elektrischen Kontakt zueinander gebracht wurden. Durch Anlegen einer Spannung an eine von den beiden Metallplatten kann der Stromfluss unterbrochen werden. Die Spannung ist hierbei von den Metallarten abhängig. Physikalisch beruht dieses Phänomen in der Kontaktpotentialdifferenz zwischen zwei Metallen, die sich in unmittelbarer Nähe befinden und elektrisch verbunden sind. Die unterschiedlichen Austrittsarbeiten der Metalle führen zu einem Elektronenaustausch von dem Metall mit der kleineren Austrittsarbeit hin zum Metall mit der höheren Austrittsarbeit. Dieses Prinzip wird hinsichtlich der örtlichen Auflösung durch Verkleinerung der Plattenflächen verbessert. Jedoch zeigen sich Begrenzungen aufgrund der

schnell abklingenden Stromstärken, sodass im Nanometerbereich keine Strommessung erfolgen kann. So wird die elektrostatische Kraft im Nanometerbereich gemessen. Diese Möglichkeit bietet das AFM. Um mittels AFM die Oberflächenpotentiale zu messen, muss eine Spannung angelegt werden, damit die elektrostatische Kraft zwischen *Cantileverspitze* und Probenoberfläche minimiert wird. In dieser Arbeit werden amplitudenmodulierte KPFM-Messungen durchgeführt.

4 Untersuchung der DNA-Immobilisierung

Erste grundlegende Versuche werden mit Lachsspermien-DNA durchgeführt, um die Immobilisierung von DNA auf Mica bezogen auf Magnesiumkonzentration und Detergens zu untersuchen. Ein weiterer Aspekt ist die Einführung einer AFM-alternativen Methode: Der Fluoreszenzmikroskopie. In diesem Kapitel werden die erzielten Ergebnisse der Lachsspermien-DNA-Immobilisierung bezüglich der Fluoreszenz- und Rasterkraftmikroskopie beschrieben und erläutert. Um die Immobilisierung hinsichtlich des verwendeten Puffers und des Magnesiumgehaltes zu charakterisieren, wurden Tests in TAE- und TE-Puffer durchgeführt.

Abbildung 20 und Abbildung 21 zeigen einerseits die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen in TAE-Puffer, welche nach der Anfärbung mit YOYO-1 erstellt wurden, andererseits die topographischen Aufnahmen. In den Positivkontrollen der 100 µg/ml und 10 µg/ml Konzentration sind abgegrenzte Färbespots sichtbar, die analog der DNA-Konzentration an Farbintensität verlieren. Demnach ist der Konzentrationsabstieg teilweise detektierbar. Die Positivkontrollen weisen verschieden große Punkte auf, welche intensiver fluoreszieren als der Hintergrund; zum Beispiel in der 100 µg/ml Konzentration, die mit Ethanol gespült wurde (Abbildung 21a1). Hierbei handelt es sich um DNA-Agglomerate, welche während der Anlagerung entstehen. Die Interkalation von YOYO-1 in die dsDNA bewirkt einen signifikanten Anstieg der Fluoreszenzintensität, da die aromatischen Ringe des YOYO-1-Moleküls mit den heteroaromatischen Ringen der DNA-Basen interagieren. Die Negativkontrolle ist weniger intensiv angefärbt, außer bei 10 µg/ml DNA gespült mit millipore-Wasser (Abbildung 21b). Es ist möglich, dass der Farbstoff zu sehr eingetrocknet ist, sodass er durch die anschließende Spülung mit TAE-Puffer nicht abgelöst werden kann. Zudem bilden sich unspezifische Färbewolken in den 10 und 1 µg/ml Konzentrationen aus. Die beiden letztgenannten Beobachtungen sind darauf zurückzuführen, dass die YOYO-1-Konzentration für die 10 µg/ml DNA-Konzentration mit 0,7 Basenpaaren pro YOYO-Molekül und die 1 µg/ml DNA-Konzentration mit 0,07 Basenpaaren pro YOYO-Molekül zu hoch ist. Es wurde dieselbe Färbelösung wie für die 100 µg/ml DNA-Konzentration, mit dem Verhältnis sieben Basen-

paare pro YOYO-Molekül, verwendet. Demnach liegt zu viel ungebundenes YOYO vor, so dass nicht nur die Interkalation in die DNA, sondern auch eine Anlagerung an das negativ geladene Phosphatrückgrat (Fürstenberg, et al., 2006) und eine direkte Färbung der Mica-Oberfläche erfolgt. YOYO-1 ist vierfach positiv geladen und bildet mit den negativen Ladungen des Micas ionische Wechselwirkungen aus, sodass es zu einer Anlagerung von YOYO-1 an die Mica-Oberfläche ohne einen Haftvermittler kommt.

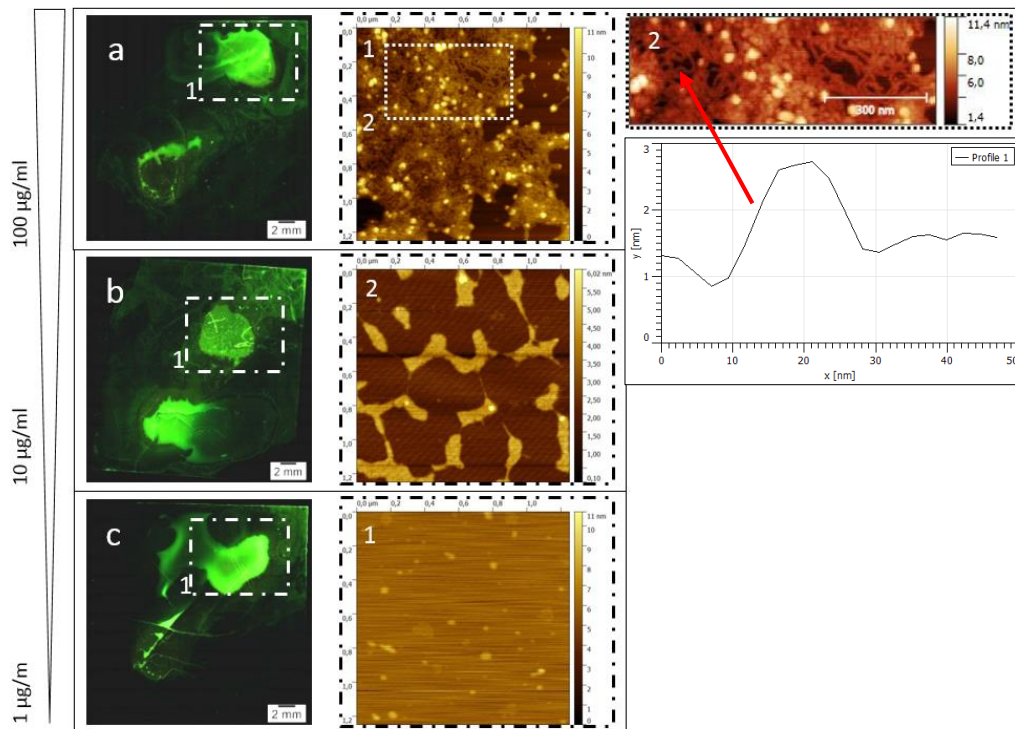


Abbildung 20: Immobilisierung von Lachsspermien-DNA in TAE-Puffer auf Mica, gespült mit millipore-Wasser

Dargestellt sind die Ergebnisse von oben nach unten in absteigender DNA-Konzentration bezüglich der Fluoreszenz- und AFM-Aufnahmen. a) Aufnahme des gesamten Micaplättchens, links unten Negativkontrolle und weiß gerahmt die Positivkontrolle, in a1) eine topographische Aufnahme aus der Positivkontrolle und a2) sichtbarer DNA-Strang. b), b1), c), c1) wie a) und a1).

Die AFM-Aufnahmen veranschaulichen die Ergebnisse der unterschiedlichen Pufferlösungen, Spülungen und DNA-Konzentrationen in Form von topographischen Aufnahmen der einzelnen Probenbereiche der Positivkontrolle. Die hellen Bereiche stellen Erhebungen dar. Es handelt sich um Rückstände, die nicht vom Substrat gespült wurden. Die dunkleren, glatten Bereiche stellen das pure Mica dar. Die Querstriche stellen Messfehler bedingt durch das Gerät und dessen Gebrauch dar. Die Aufnahmen der TAE-Proben zeigen unabhängig

vom Detergens immobilisierte Lachsspermien-DNA in Inselform in den Bereichen der Positivkontrolle. Diese Inseln und damit die Verklumpung der DNA entstehen durch Ablösungen während des Spülvorganges. In dunklen und glatten Bereichen wurden sowohl Salze als auch DNA abgelöst. Mit absteigender DNA-Konzentration werden die Inseln kleiner und die Konzentrationsabnahme der DNA ist ersichtlich. Die zugehörigen, jedoch nicht abgebildeten Negativkontrollen sind glatt und sauber.

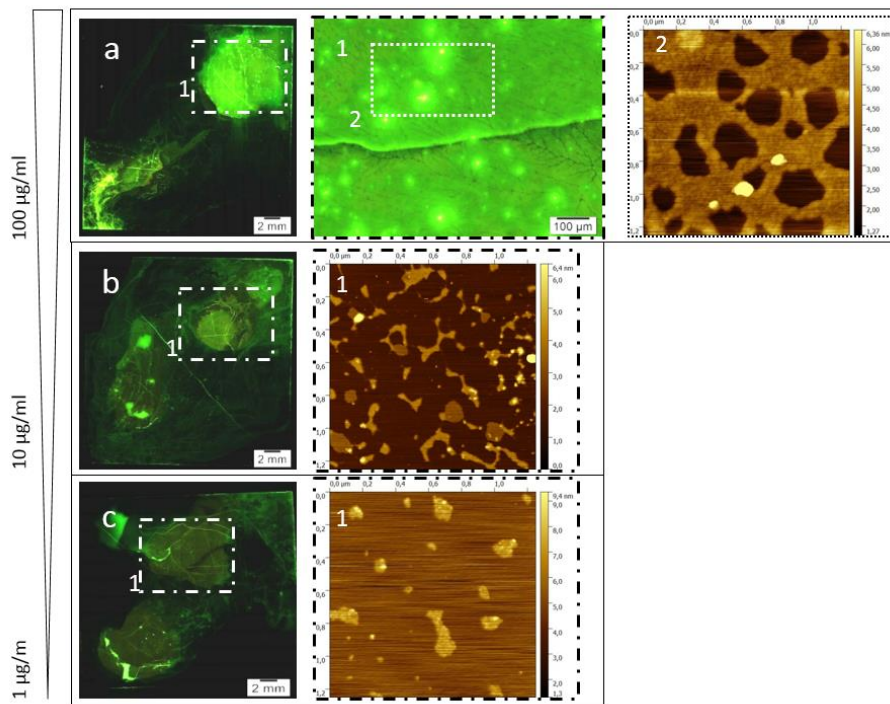


Abbildung 21: Immobilisierung von Lachsspermien-DNA in TAE-Puffer auf Mica, gespült mit Ethanol

Dargestellt sind die Ergebnisse von oben nach unten in absteigender DNA-Konzentration bezüglich der Fluoreszenz- und AFM-Aufnahmen. a) Aufnahme des gesamten Micaplättchens, links unten Negativkontrolle und weiß gerahmt die Positivkontrolle, in a1) eine topographische Aufnahme aus der Positivkontrolle und a2) sichtbarer DNA-Strang. b), b1), c), c1) wie a) und a1).

In Abbildung 20a2 ist die Doppelhelix als längliche Strukturen mit ca. 200 nm sichtbar. Das entspricht ungefähr den angegebenen 700 bp bei einer Ganghöhe (Länge der Helix für eine komplette Windung) der DNA von 3,34 nm. Der Durchmesser der DNA beträgt 2 nm (Abbildung 20a2), wie erwartet. Bezüglich der Detergenzien fällt auf, dass sich die mit Ethanol gespülte DNA stärker zusammengezogen hat als jene, welche mit millipore-Wasser gespült wurde. Sowohl Ethanol als auch millipore-Wasser lösen die Salze. Aber Ethanol entzieht der DNA Protonen, da die OH-Gruppe des Ethanols schwach sauer und damit in der Lage ist,

ein Proton abzuspalten. Dies wird dadurch begünstigt, dass die Phosphatgruppen im basischen Bereich ab einem pH-Wert von 6,8 deprotonieren. Auf diesem Wege wird der DNA Wasser entzogen und sie zieht sich während des Spülvorganges zusammen.

Die Abbildung 22 und Abbildung 23 bilden die Ergebnisse auf Mica mit TE-Puffer ab. Die Ergebnisse der Fluoreszenz sind äquivalent zu denen in TAE-Puffer, bis auf das getrübbte Fluoreszenzsignal (Marie, Vaultot, & Partensky, 1996). Auch diese Messungen zeigen den erwarteten Konzentrationsabstieg der DNA in Form einer Inselbildung. In den Konzentrationsstufen von 10 µg/ml bis 100 µg/ml liegt bei den Ethanol-Proben mehr immobilisiertes Material als bei den millipore-Proben vor. Dies deutet darauf hin, dass die Ethanolspülung einen fixierenden Effekt hat.

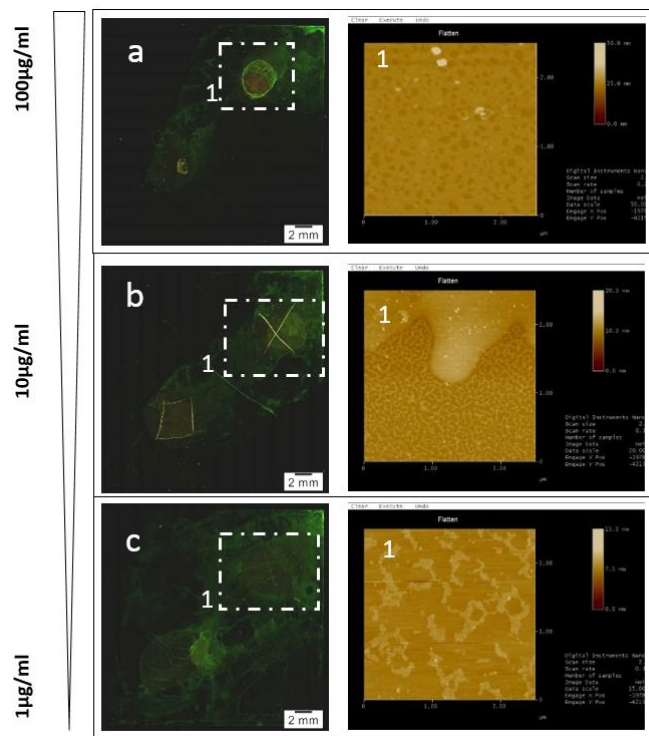


Abbildung 22: Immobilisierung von Lachsspermien-DNA in TE-Puffer auf Mica, gespült mit millipore-Wasser

Dargestellt sind die Ergebnisse von oben nach unten in absteigender DNA-Konzentration bezüglich der Fluoreszenz- und AFM-Aufnahmen. A) Aufnahme des gesamten Micaplättchens, links unten Negativkontrolle und weiß gerahmt die Positivkontrolle, in a1) eine topographische Aufnahme aus der Positivkontrolle und a2) sichtbarer DNA-Strang. b), b1), c), c1) wie a) und a1).

Die Proben, auf denen DNA in TE-Puffer immobilisiert wurde, sind in jeder Konzentrationsstufe flächenmäßig dichter belegt als die TAE-Proben. Im TE-Puffer sind 35 mM Magnesi-

umchlorid enthalten und im TAE-Puffer nur 12,5 mM Magnesiumacetat. Je mehr Magnesiumionen vorliegen, umso intensiver haftet die DNA an Mica, da die divalenten Kationen mit dem negativ geladenen Phosphatrückgrat der DNA interagieren und somit eine elektrostatische Brücke zwischen Mica und der DNA aufbauen.

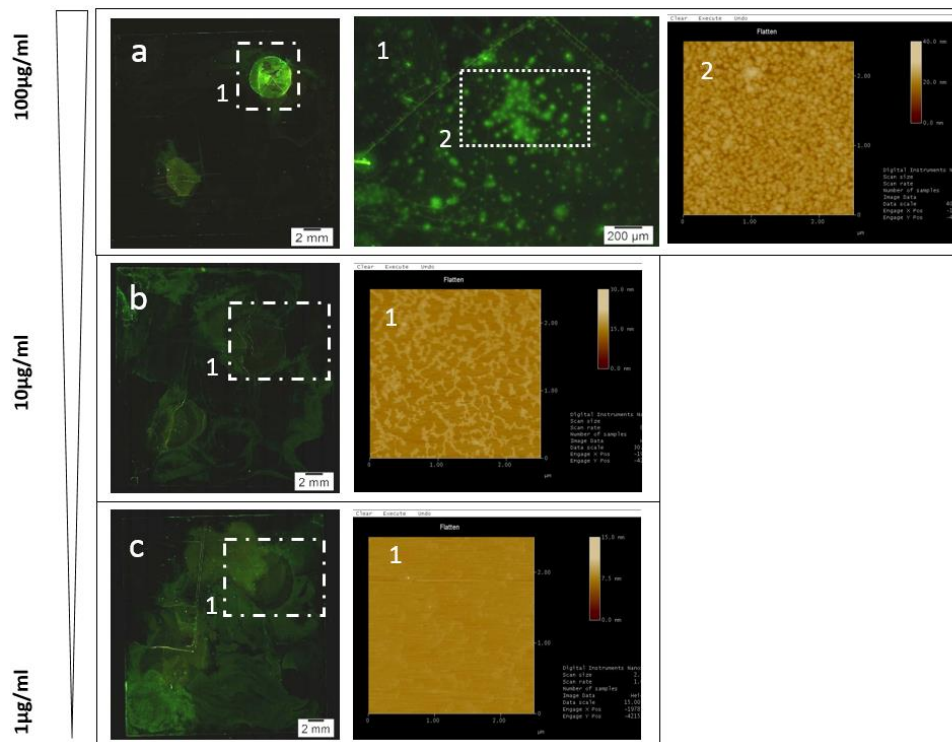


Abbildung 23: Immobilisierung von Lachsspermien-DNA in TE-Puffer auf Mica, gespült mit Ethanol

Dargestellt sind die Ergebnisse von oben nach unten in absteigender DNA-Konzentration bezüglich der Fluoreszenz- und AFM-Aufnahmen. A) Aufnahme des gesamten Micaplättchens, links unten Negativkontrolle und weiß gerahmt die Positivkontrolle, in a1) eine topographische Aufnahme aus der Positivkontrolle und a2) sichtbarer DNA-Strang. b), b1), c), c1) wie a) und a1).

Die erzielten Ergebnisse verdeutlichen, dass Ethanol als Detergens durch den Entzug des Wassers negativ Einfluss auf die Struktur der DNA nimmt. Ethanol besitzt eine Hydroxylgruppe, welche schwach sauer und in der Lage ist, ein Proton abzuspalten. Dies wird dadurch begünstigt, dass die Phosphatgruppen im basischen Bereich ab einem pH-Wert von 6,8 deprotonieren. Gleichzeitig wird weniger DNA abgelöst, da Ethanol die Probe fixiert. Diese Erkenntnisse konnten mit Untersuchungen mit einer fünfstufigen Ethanoltrocknungsreihe untermauert werden. Daher wird millipore-Wasser als Detergens für die DNA-Origami bevorzugt eingesetzt, da es wichtig ist, die DNA-Origami nicht in ihrer Struktur zu beeinflussen.

Die Positivkontrollen der TE-Proben sind dichter belegt als die der TAE-Proben. Dies ist auf den erhöhten Magnesiumgehalt von 35 mM im TE-Puffer zurückzuführen. Das Phosphatrückgrat der DNA ist hydrophil und negativ geladen, sodass ein Elektron des Magnesiums anbinden kann. Das zweite Elektron bindet an die Hydroxylgruppen des gespaltenen Micas. Je mehr Magnesium dem Puffer zugesetzt ist, umso mehr DNA kann binden, gleichzeitig neigt sie aber auch stärker zum Verklumpen. Für die DNA-Origami wird der TE-Puffer weiterverwendet.

Die Anfärbung der DNA mit YOYO-1 ist aufgrund der nicht angepassten Konzentration zu unspezifisch, das zeigt die Bildung der Färbewolken auf dem kompletten Substrat. Es liegt zu viel ungebundenes YOYO-1 vor, welches Mica direkt anfärbt, da Mica und YOYO-1 eine entgegengesetzte Ladung aufweisen. Weiterhin ist der Färbeeffect im TAE-Puffer intensiver, was auf die höhere Salzkonzentration (35 mM Magnesiumchlorid) im TE-Puffer zurückzuführen ist. Demnach beeinträchtigen Salze jeglicher Art die Fluoreszenzintensität des Farbstoffes. Je mehr Salze der Puffer enthält, in dem YOYO-1 gelöst ist, umso schwächer fällt die Färbung aus. YOYO-1 ist im basischen Bereich 4-fach positiv geladen und konkurriert mit den positiven Magnesiumionen um eine Bindung an das negativ geladene Phosphatrückgrat der DNA. Je mehr Magnesiumionen enthalten sind, umso stärker ist dieser Effekt, da weniger YOYO-1 an die DNA binden kann. Die Färbung fällt schwächer aus und die DNA verklumpt noch stärker. Die DNA neigt aufgrund der elektrostatischen Wechselwirkungen zum Verklumpen auf dem Substrat. Weitere Fluoreszenzuntersuchungen mit geringeren DNA-Konzentrationen (Anlehnung an DNA-Origami-Konzentration), angepasstem Basenverhältnis (1 zu 12,5 (Fürstenberg, et al., 2006)) für jede Konzentration und die Lösung in salzfreiem Puffer haben keine auswertbaren Ergebnisse hervorgebracht, sodass die Schlussfolgerung gezogen werden kann, dass die Umgebungsbedingungen die mögliche Auflösung limitieren.

Mithilfe dieser Voruntersuchungen an Lachsspermien-DNA konnten die Bindungsmechanismen in Abhängigkeit der Magnesiumkonzentration und der Einfluss des Spüldetergens charakterisiert werden. Unter den gegebenen Bedingungen ist es nicht möglich, die Immobilisierung der DNA-Origami-Strukturen mittels Fluoreszenzmarkierung zu detektieren.

Das folgende Kapitel beschreibt den Entwicklungsstand der Nanoimprint-Lithographie als zentrale Strukturierungsmethode für die biokompatiblen Kavitäten. Diese beiden Kapitel legen den Grundstein für 6. Immobilisierung von DNA-Origami.

5 Nanoimprint-Lithographie

Die Nanoimprint-Lithographie ist ein Verfahren für die Strukturierung im Nanometerbereich, welches auf mechanischer Einwirkung basiert. Die TU Chemnitz hat sich innerhalb des cfaed-Clusters zum Ziel gesetzt, die NIL zu entwickeln und etablieren.

Die Methode zur geplanten Herstellung der hydrophilen Kavitäten für die DNA-Origami-Strukturen kombiniert die zwei zentralen lithographischen Strukturierungsmethoden im Nanometerbereich – *eBeam* und NIL.

Der Herstellungsprozess der strukturierten Wafer ist in Abbildung 24 dargestellt. Mittels *eBeam* und anisotropen Siliziumätzen wird der NIL-Master – bestehend aus Silizium mit den geätzten Strukturen – realisiert. Anschließend werden zum Schutz des sehr kostenintensiven Silizium-Masters von diesem Arbeitsstempel bestehend aus Glas und einem Polymer abgeformt. Mithilfe des Arbeitsstempels wird der Wafer – Siliziumdioxid mit zusätzlich aufgebrachter hydrophober Schicht (DLC, CF) – in ein Prototypen-2-Lack-System unter Druck und Belichtung geprintet. Im weiteren Verlauf wird der Arbeitsstempel entformt, der Lack mittels Trockenätzen bis zum Substrat geöffnet und das Substrat abschließend über die Lackmaske strukturiert. Abschließend wird die hydrophobe Schicht über die Lackmaske geätzt, welche nach erfolgter Strukturierung entfernt wird.

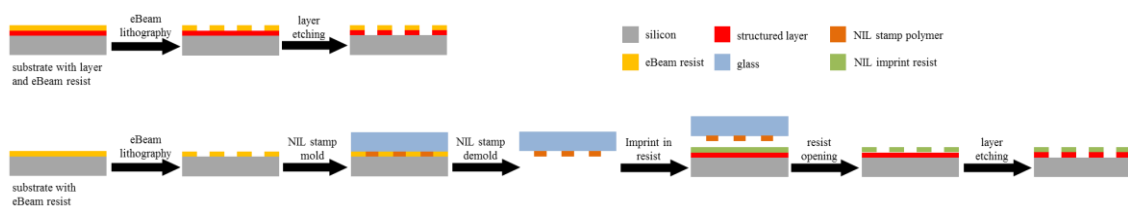


Abbildung 24: Kombination von *eBeam* und NIL für die Strukturen im Nanometerbereich

Herstellungsprozess der hydrophilen Kavitäten über eBeam zur Formung eines NIL-Stempels und der eigentlichen NIL-Prozess mit dem innovativen 2-Schicht-Lacksystem (entnommen aus (Helke, et al., 2014)).

Das abgebildete Layout ist die Grundlage für die Erstellung des Silizium-NIL-Masters, welcher mittels *eBeam* realisiert wird (Abbildung 25). Dabei stellen insbesondere die kritischen Anforderungen, wie die angewinkelte Ecke, an das Layout Herausforderungen dar.

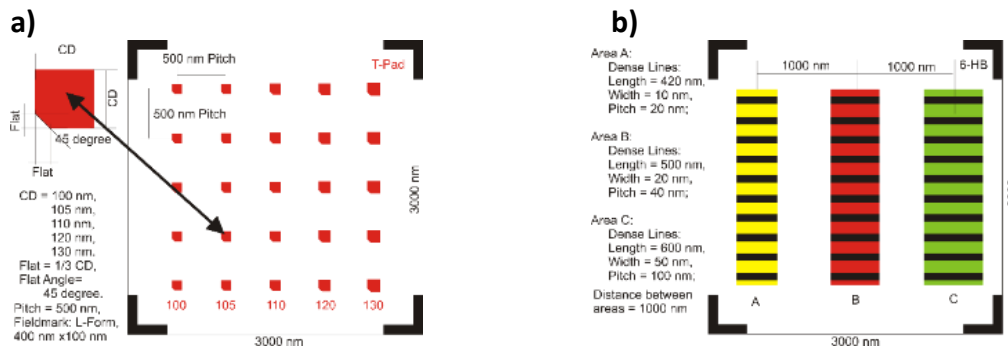


Abbildung 25: NIL-Layout für die geplante Immobilisierung der tPads® und 6HB

In a) ist der Strukturierungsplan für die tPad®-kompatiblen Kavitäten für den NIL-Master dargestellt. In b) äquivalent für die 6HB (entnommen aus cfaed-Report des BAC-Pfades vom 25. März 2015 von Prof. Mertig)

Der erste Schritt in Richtung Etablierung des NIL-Prozesses konnte umgesetzt werden. Denn es ist möglich, die benötigten Stempel mit dem kritischen Abmaß und der angestrebten Form mit der angewinkelten Ecke (komplementäres Ziellayout der DNA-Origami, siehe Abbildung 26) mittels der Elektronenstrahlolithographie zu realisieren. Das tPad®-Layout mit der angewinkelten Ecke konnte realisiert werden (Maße 100 x 100 nm² – 150 x 150 nm², 1/3 des Abmaß entspricht der angewinkelte Ecke, Pitch 500 nm). Bei der Herstellung des 6HB-Layouts wurden die erzielbaren kritischen Abmessungen von 50 nm Breite umgesetzt. Bei den 20 nm breiten Linien traten Defekte bei der Entwicklung der Lackstege auf, was im schlechten Entwicklungsprozess der sehr kleinen Strukturgrößen begründet ist (siehe Abbildung 26b). Der Arbeitsstempel für die Integration der 6HBs konnte bisher leider nicht erfolgreich hergestellt werden. Die sehr geringen Strukturgrößen von 20 nm und das vorliegende Aspektverhältnis der 40 nm tiefen Strukturen führten zu noch keinem herstellbaren Muster an Arbeitsstempeln. Dies ist begründet in der vorliegenden Substratauswahl (Verwölbung und Rauheit der Ausgangswafer), sowie in dem sich noch in der Entwicklung und Evaluierung befindlichen Übertragungsprozess des Silizium-Masters in das Stempelpolymer. Dabei treten vorwiegend bei sehr kleinen Strukturen noch Probleme bezüglich der Übertragung in den Arbeitsstempel-Lack auf. Dies muss durch geeignete Parameterprozesse wie Belichtung, Temperung, Abformzeit und eventuelle angepasste Vorbehandlungen wie Polieren der Substrate optimiert werden.

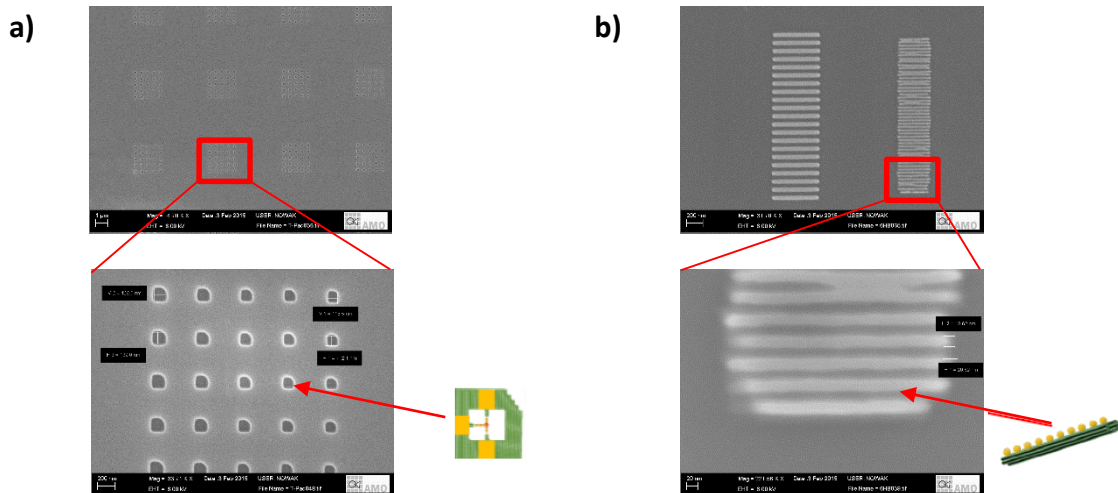


Abbildung 26: NIL-Master für die tPads® und 6HB (REM-Aufnahmen)

In a) ist der Siliziummaster für die tPad®-kompatiblen Kavitäten dargestellt. In b) äquivalent für die 6HB (von Dipl.-Ing. Christian Helke).

Zum Schutz des Silizium-Masters für die tPads® konnten Arbeitsstempel bestehend aus Glas und einem Polymer abgeformt werden (Abbildung 27). Es handelt sich um ein Negativ des Masters.

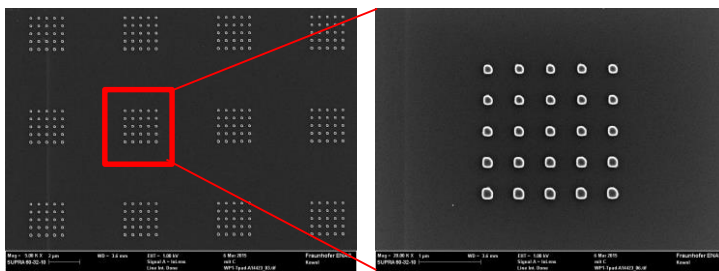


Abbildung 27: NIL-Arbeitsstempel für die tPads® (REM-Aufnahmen)

In dieser Abbildung ist der Arbeitsstempel für die tPads® dargestellt (von Dipl.-Ing. Christian Helke).

Dieser Arbeitsstempel wird unter Druck und Belichtung durch die NIL-Anlage EVG 6200NT in den Prototyp-Lack gedrückt. Der Prototyp des 2-Stufen-Lacks wird durch MicroLack technology MRT zur Verfügung gestellt. Das System besteht aus einem dünnen und einem dicken Lack. Der Arbeitsstempel wird in den dünnen Imprintlack geprintet. Im Anschluss wird der Imprintlack mittels CF_4 -Plasma geätzt und damit bis zum Substrat geöffnet. Wenn der Imprintlack geöffnet ist, wird der dicke Transferlack mit O_2 -Plasma geätzt. Der Imprintlack silanisiert (Bindung einer Silangruppe an die Oberfläche) im Zuge dessen und bildet eine SiO_2 Hartmaske aus. Der Transferlack kann dadurch theoretisch selektiv bis zum Substrat

geätzt werden, wenn der Imprintlack von der Dicke genau auf die Nanostruktur abgestimmt ist. Das 2-Stufen-Lack-System wird benötigt, da dünne Lacke keine Prozesskontrolle beim Ätzen gewährleisten und sie nicht tief geätzt werden können. Des Weiteren sind keine kritischen Ätzungen mit dünnen Lacken möglich. Ein generelles Problem beim NIL-Prozess stellt die Homogenität der Strukturübertragung bezogen auf den ganzen Wafer dar. Durch das selektive Öffnen des Lacks soll es möglich sein, dieses Problem zu umgehen.

Der Imprintlack kann durch das CF_4 -Plasma geöffnet werden (Abbildung 28). Damit ist die Grundlage für die weitere Strukturierung geschaffen. Jedoch bleiben ungeklärter Weise an dem NIL-Stempel Rückstände des Lacks haften, die sich nicht ablösen lassen und damit den Arbeitsstempel unbrauchbar machen. Aktuell wird für jeden einzelnen Imprint ein gesonderter Arbeitsstempel benötigt. Damit verläuft der Prozess verlustreich und sehr langsam. Daher muss hier eine Anpassung der Imprintparameter, vorzugsweise Belichtungszeit und –stärke, erfolgen.

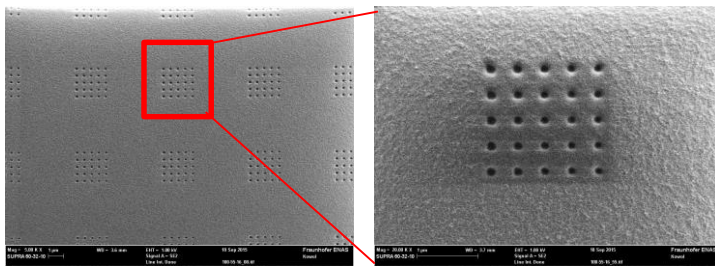


Abbildung 28: Ätzen mit CF_4 -Plasma der ersten Lackschicht, 24 sec (REM-Aufnahmen)

Abgebildet ist die oberste Lackschicht nach 24sec CF_4 -Plasma (von Dipl.-Ing. Christian Helke).

Im zweiten Schritt wird der Transferlack mit O_2 -Plasma geätzt (Abbildung 29). Die erhaltenen Kavitäten nach der Lacköffnung sind seitlich aufgeweitet und entsprechen nicht mehr dem Layout. Die angestrebte Struktur ist in Folge dessen nicht mehr darstellbar. Demzufolge konnte die Strukturierung im zweiten Schritt nicht homogen umgesetzt werden. Dies widerspricht der Theorie der selektiven Lack-Öffnung und den theoretischen Untersuchungen im Vorfeld bezüglich Lackdicke und Aufschleudererzahl.

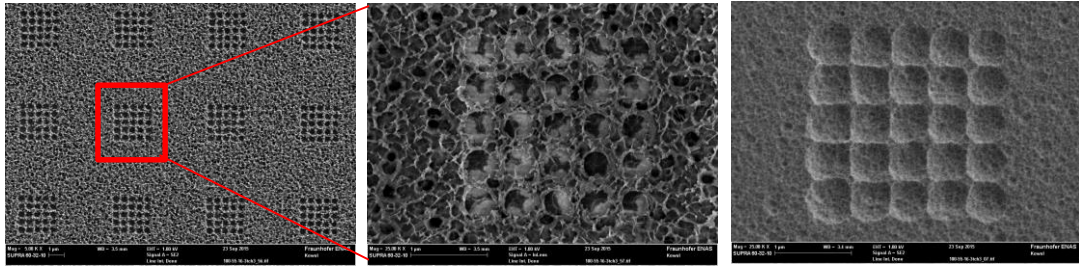


Abbildung 29: Ätzen mit O_2 -Plasma der zweiten Lackschicht, 2 min (REM-Aufnahmen)

Abgebildet ist die oberste Lackschicht nach 2min O_2 -Plasma (von Dipl.-Ing. Christian Helke).

Die Prozesskontrolle gestaltet sich komplex und schwierig. Des Weiteren sind die erhaltenen Ergebnisse ungenügend reproduzierbar. Der NIL-Prozess und das 2-Stufen-Lack-System müssen weiter entwickelt und evaluiert werden.

Nach dem momentanen Entwicklungsstand ist es nicht möglich, die DNA-Origami in Nanostrukturen zu immobilisieren. Im folgenden Kapitel wird aus diesem Grund die Untersuchung und Charakterisierung des Bindeverhaltens der DNA-Origami an den unstrukturierten Oberflächen stattfinden und der Fokus auf die Entwicklung weiterer Immobilisierungsansätze gelegt.

6 Immobilisierung von DNA-Origami

Zum jetzigen Zeitpunkt ist es nicht möglich, DNA-Origami in strukturierten Oberflächen zu immobilisieren, da die Strukturierung der Wafer mittels NIL nicht ausgereift ist. Deshalb wird die Immobilisierung von DNA-Origami auf unstrukturierten Oberflächen charakterisiert und weitere Ansätze der Integration getestet. Das Kapitel umfasst die Immobilisierung der einzelnen DNA-Origami-Strukturen auf verschiedenen Oberflächen, die Charakterisierung des Oberflächenpotentials sowie die Integration mittels molekularem *Lift-off* und elektrostatischer Felder.

6.1 Unstrukturierte Oberflächen

In diesem Unterkapitel wird die Immobilisierung von DNA-Origami auf hydrophilen und hydrophoben Oberflächen beschrieben. Im Hinblick auf den zu prüfenden theoretischen Ansatz von *Helke et al.*, sind die Ergebnisse nach hydrophilen Oberflächen – Mica, thermisches Siliziumdioxid nichtaktiviert und drei Modifikationen mittels Sauerstoffplasma – und hydrophobe Oberflächen – CF, DLC und HMDS – sortiert. So können Rückschlüsse über die Immobilisierung und das Bindeverhalten der verschiedenen DNA-Origami bei gleichem Protokoll gezogen werden. Die Untersuchung erfolgt mittels AFM, da die Fluoreszenzmethode vor Ort aufgrund eines zu schwachen Signales bei verhältnismäßig hohen Konzentrationen nicht realisierbar ist. Die drei verschiedenen DNA-Origami-Strukturen – tPads®, Pads und 6HB – in einer Konzentration von 3 nM in TE-Puffer werden bei gleichbleibendem Protokoll auf der Oberfläche abgeschieden und untersucht. Es existiert je eine $5 \times 5 \mu\text{m}^2$ Übersichts- und eine $1 \times 1 \mu\text{m}^2$ Detailaufnahme. Aus den Übersichtsaufnahmen wurde ein Oberflächenprofil extrahiert, welches die Höhenbestimmung der DNA-Origami und eine Aussage über den Bedeckungsgrad ermöglicht. Des Weiteren ist der R_a -Wert (Rauigkeitswert in nm) der glatten Oberfläche angegeben, der einen Vergleich der Oberflächen hinsichtlich der spezifischen Rauigkeit und DNA-Origami-Bedeckung untereinander zulässt.

6.1.1 Mica

Mica ist das Standardsubstrat für die Immobilisierung von DNA-Origami, da mittels Spaltung eine glatte und saubere aktivierte Oberfläche mit einer Vielzahl von Hydroxylgruppen hergestellt werden kann. In Abbildung 30 sind die DNA-Origami-Strukturen auf Mica abgebildet. Mittels Rauigkeitswertbestimmung der Rohdaten durch Gwyddion ergibt sich ein R_a -Wert von 0,149 nm auf der abgebildeten Mica-Oberfläche (Abbildung 30a) und liegt damit unter dem in der Literatur angegebenen Wert von 0,2 nm (Senden & Ducker, 1992).

Die $5 \times 5 \mu\text{m}^2$ AFM-Aufnahme der tPads[®] zeigt eine Bedeckung bei einem Höhenunterschied von 2 nm (Abbildung 30b). Das zugehörige Höhenprofil weist entsprechend der ersten Beobachtung durch die AFM-Aufnahme Höhenunterschiede von bis zu 2 nm auf. Dies entspricht der Höhe der tPads[®] und damit der molekularen Struktur. Im Detailausschnitt wird sichtbar, dass die tPads[®] verformt sind und das Rahmenverhältnis der tPads[®] nicht wie erwartet ausgebildet ist. Sie legen sich nicht immer plan ab, da sie nicht basenkorrigiert sind und so intrinsische Kräfte – innere Spannungen – entstehen, die die Immobilisierung beeinflussen. Des Weiteren fehlt die Strebe im inneren Bereich, was auf den Herstellungsprozess zurückzuführen ist.

Die Pads lagern sich ebenfalls an Mica an (Abbildung 30c). Der $5 \times 5 \mu\text{m}^2$ Ausschnitt der Probe ist fast vollständig mit Pads bedeckt, sie bilden einen Teppich aus. Die Pads legen sich plan ab und weisen einen Höhenunterschied im Profil von bis zu ca. 4,5 nm auf, die AFM-Aufnahme gibt eine Strukturhöhe von ca. 5 nm an. Das Höhenprofil weist wenige Grundflächenbereiche auf, was darauf schließen lässt, dass ein hoher Bedeckungsgrad der Pads auf Mica vorliegt.

Die 6HB aggregieren sichtlich, es sind keine Einzelstrukturen wie in 3.1.2 zu erkennen (Abbildung 30d). Das liegt an der hohen 6HB- und Magnesiumkonzentration. Weiterführende Untersuchungen zeigten, dass in einer 1 nM Konzentration der 6HB das Problem nicht auftritt. Das Höhenprofil weist eine Strukturhöhe von 6 nm auf bei vielen Leerflächen dazwischen.

Trotz gleicher Konzentration, einem Magnesiumgehalt von 32,75 mM und gleicher Präparation weisen die DNA-Origami-Strukturen auf Mica einen signifikant unterschiedlichen Bedeckungsgrad auf. *Woo und Rothmund* postulierten die Abhängigkeit der Bindeintensität von der molekularen Struktur der DNA-Origami bei einem Magnesiumgehalt von 12 mM.

2D-Konstrukte binden stärker als lineare dsDNA/1D-Motive mit derselben Nukleotidanzahl und größere und/oder flachere Objekte intensiver als kleinere/3D (Woo & Rothmund, 2014). Da in der vorliegenden Arbeit mit einem Magnesiumgehalt von 32,75 mM gearbeitet wird, kann eine erhöhte Bindeintensität der DNA-Origami angenommen werden. Je mehr Magnesiumionen vorliegen, umso flächiger ist die Bedeckung. Die beschriebenen Mechanismen treffen auch bei einem Magnesiumgehalt von 32,75 mM zu. Dafür spricht, dass die Pads einen höheren Bedeckungsgrad als die 6HB aufweisen. Demnach binden, wie von *Woo und Rothmund* beschrieben, 2D-Konstrukte und flache Strukturen besser als 1D-Strukturen. Die tPads® reihen sich in diese Beobachtung nicht ein. Jedoch zeigten weiterführende Studien eine geringe Stabilität und ein Absetzen der Strukturen am Tube-Rand der Lösung aus ungeklärten Gründen trotz LoBind-Tubes.

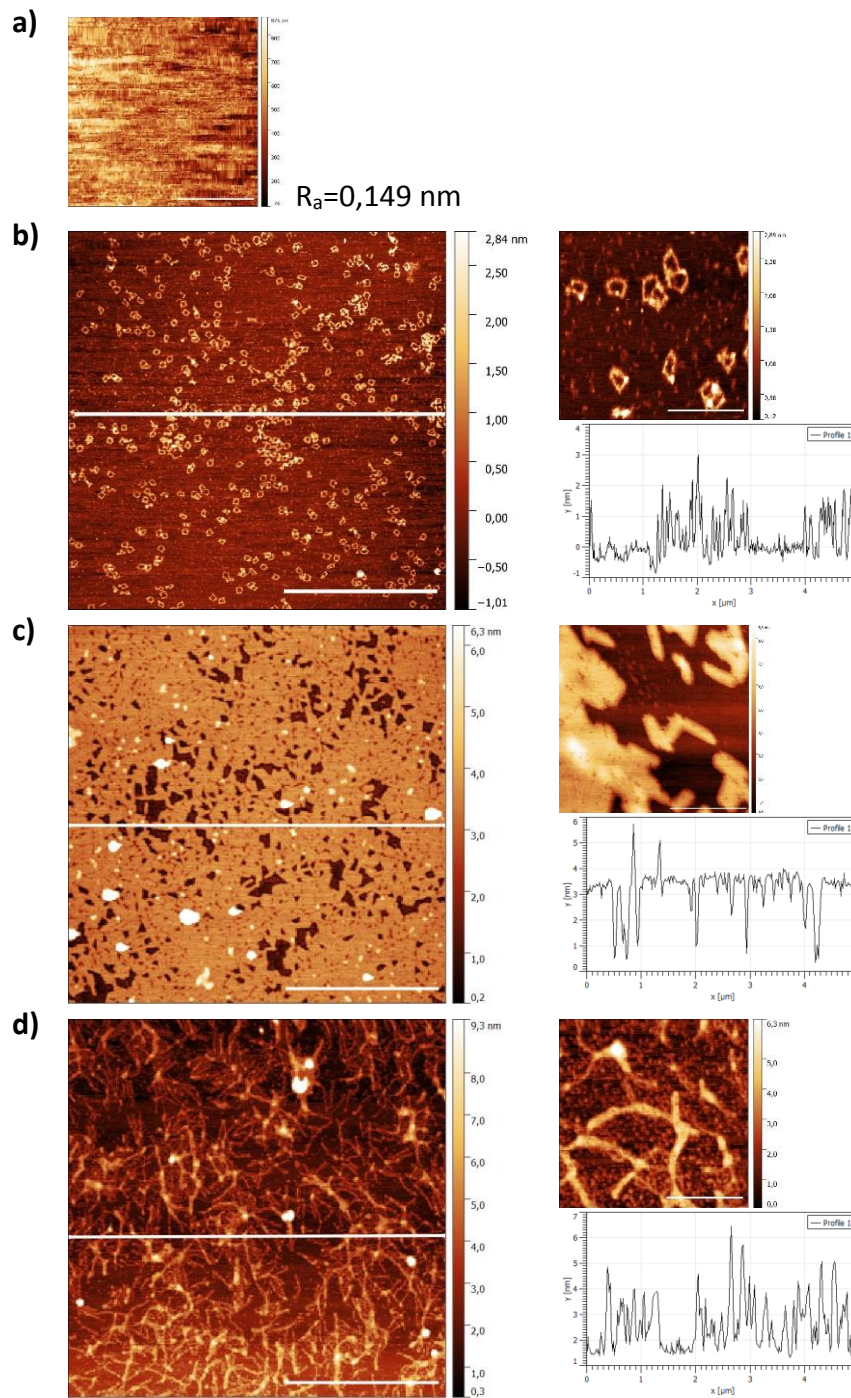


Abbildung 30: Immobilisierung der DNA-Origami auf Mica

Gezeigt wird das a) pure Mica, die Immobilisierung der b) tPads®, c) Pads und d) 6HB auf Mica hinsichtlich der optischen/topographischen Darstellung unter Angabe des R_a -Wertes für das Substrat und des extrahierten Oberflächenprofils für den $5 \times 5 \mu\text{m}^2$ -Ausschnitt; Skala: $2 \mu\text{m}$, Detailaufnahmen: 400 nm .

Die Messungen auf Mica dienen dem Vergleich und der Charakterisierung der Bindeparameter. Die selektive Immobilisierung wird auf Siliziumdioxid-Oberflächen – dem Grundmaterial der Halbleitertechnik – angestrebt. Mittels gezielter Oxidation und entsprechender Modifikation mit Sauerstoffplasma kann eine Oberfläche geschaffen werden, zu der die DNA-Origami eine hohe Bindeaffinität aufweisen. Das folgende Unterkapitel thematisiert die Immobilisierung der DNA-Origami auf thermischen Siliziumdioxid und drei unterschiedlichen Sauerstoffplasma-Aktivierungen, um die geeignetsten Parameter für die geplante Immobilisierung in mikro- und nanostrukturierten Oberflächen und damit die Aktivierung und Strukturierung der hydrophilen Kavitäten zu ermitteln.

6.1.2 Thermisches Siliziumdioxid

Siliziumwafer stellen in der Halbleitertechnologie das Standardsubstrat und damit die Oberfläche der Wahl für die Integration von funktionalisierten DNA-Origami dar. Der Siliziumwafer besitzt immer mindestens eine native Siliziumdioxidschicht von 2 bis 3 nm, da die Oberfläche an der Luft oxidiert. Im Folgenden wird das Siliziumdioxid thermisch aufoxidiert, es entsteht eine ca. 300 nm dicke Schicht Siliziumdioxid, auf welcher die DNA-Origami abgeschieden werden. Die Untersuchung findet am unbehandelten Substrat statt und am mit Sauerstoffplasma modifizierten, um Unterschiede im Bindeverhalten feststellen zu können und die bestmögliche Aktivierung und deren Parameter zu identifizieren.

Der R_a -Wert der unbehandelten Siliziumdioxidoberfläche beträgt 0,223 nm im Vergleich zu Mica mit einem R_a -Wert von 0,149 nm. Damit ist die Siliziumdioxidoberfläche 0,079 nm rauer. Es wird angegeben, dass Siliziumdioxid nach der Behandlung mit Flusssäure einen Rauigkeitswert von unter 0,3 nm aufweist (Gopinath & Rothmund, 2014). Demnach ist das verwendete Substrat wesentlich glatter als das modifizierte der Literatur. Somit wird eine vergleichsweise höhere Bindeintensität erwartet.

Alle drei Strukturen weisen im Vergleich zu Mica einen wesentlich geringeren Bedeckungsgrad auf (Abbildung 31).

Das Höhenprofil der tPads® gibt Höhen bis zu 5 nm an, obwohl die spezifische Höhe der Struktur nur 2 nm beträgt. Die tPads® aggregieren und bilden längere, höhere Stränge aus (Abbildung 31a).

Die Pads legen sich gleichmäßig mit kleineren „Leerstellen“ auf der Siliziumdioxidoberfläche ab. Die Bedeckung ist wesentlich höher als die der tPads®, obwohl eine identische Konzentration vorliegt. Wie in 6.1.1 erwähnt, wurde ein Absetzen der tPads® am Tube-Rand beobachtet, sodass angenommen werden kann, dass der geringe Bedeckungsgrad darauf beruht.

Die 6HB weisen keine Aggregation auf Siliziumdioxid auf und ihr Höhenprofil bildet Höhen über 6 nm äquivalent des molekularen Aufbaus ab (Abbildung 31c).

Gopinath und Rothmund beobachteten eine Abhängigkeit der Bindeintensität von der spezifischen Rauigkeit einer hydrophilen Oberfläche (Gopinath & Rothmund, 2014). Je glatter die Oberfläche – je niedriger der R_a -Wert – umso höher die Bindeintensität. Die Messungen aus Abbildung 31 bestätigen dies. Demnach begünstigt eine glatte hydrophile Oberfläche die Bindeintensität der DNA-Origami.

Aus der Literatur geht hervor, dass DNA-Origami mit SiO_2 eine weniger intensive Bindung eingehen bei gleichbleibendem Magnesiumgehalt, da die negative Ladungsdichte des SiO_2 niedriger ist als die der Mica-Oberfläche (Pillers, Goss, & Lieberman, 2014). Die erhaltenen Ergebnisse bestätigen eine geringere Haftung der DNA-Origami an SiO_2 . Theoretisch befinden sich keine Hydroxylgruppen an der Oberfläche des Siliziumdioxids. Aufgrund der nachweisbaren Bindung kann davon ausgegangen werden, dass das Siliziumdioxid an Luft Wasserstoff aufnimmt und so SiOH -Gruppen (Silanole) in geringer Zahl entstehen, sodass eine Bindung der DNA-Origami über Magnesiumionen möglich ist.

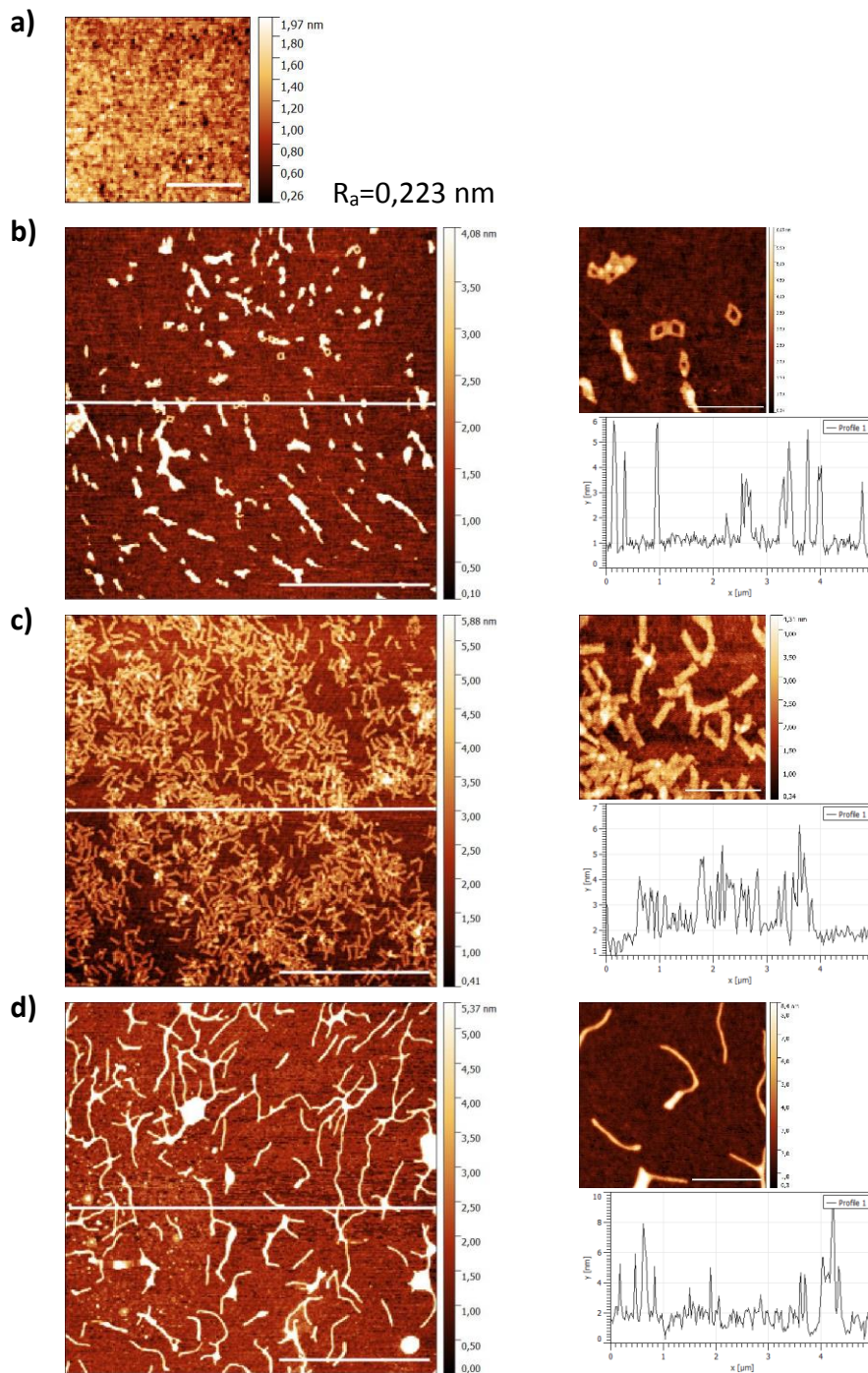


Abbildung 31: Immobilisierung der DNA-Origami auf Siliziumdioxid

Gezeigt wird das a) pure Siliziumdioxid, die Immobilisierung der b) tPads®, c) Pads und d) 6HB auf Siliziumdioxid hinsichtlich der optischen/topographischen Darstellung unter Angabe des R_a -Wertes für das Substrat und des extrahierten Oberflächenprofils für den $5 \times 5 \mu\text{m}^2$ -Ausschnitt; Skala: $2 \mu\text{m}$, Detailaufnahmen: 400 nm .

Aufgrund der spezifischen Rauigkeit und der geringeren Dichte der Hydroxylgruppen ist die unbehandelte Siliziumdioxid-Oberfläche nicht geeignet, um tPads® und 6HB anzulagern. Im Gegensatz zu den Pads weisen sie im Vgl. zu Mica einen signifikant niedrigeren Bedeckungsgrad auf. Unter Beachtung der Möglichkeit des Absetzens der tPads® am Tube-Rand, ist die Annahme der molekularen Abhängigkeit der Bindeintensität bestätigt worden (Woo & Rothmund, 2014).

Mittels gezielter Modifikation durch Sauerstoffplasma kann eine Mica-ähnliche Oberfläche und damit eine bessere Anlagerung erzielt werden. Die Oberflächenmodifikation mittels Sauerstoffplasma schafft Hydroxylgruppen und damit eine negativere Ladungsdichte wie bei Pillers *et al.* und Gopinath und Rothmund beschrieben (Gopinath & Rothmund, 2014) (Pillers, Goss, & Lieberman, 2014). Die Bindeintensität nimmt zu, die Ladungsdichte und Hydrophilität wird erhöht und die Oberfläche geglättet. Demnach wird nach der Modifikation mit Sauerstoffplasma ein höherer Bedeckungsgrad erwartet, da die übrigen Parameter invariant sind.

Für den Vergleich und die optimale Anlagerung von DNA-Origami auf Siliziumdioxidoberflächen, werden drei verschiedene Parametersätze für die Sauerstoffplasma-Aktivierung genutzt. Der bestmögliche Parametersatz hinsichtlich Bedeckung und Ausprägung der DNA-Origami wird für die Herstellung/Ätzung der DNA-Origami-kompatiblen Kavitäten im Rahmen des Integrationsansatzes nach Helke *et al.* übernommen.

Im Vergleich zum Rauigkeitswert der unmodifizierten Siliziumdioxid-Oberfläche weist die nach 1 modifizierte Oberfläche eine Glättung um 0,029 nm von 0,223 nm auf 0,194 nm auf (Abbildung 32a). Eine glattere Oberfläche und das Sauerstoffplasma bedingen theoretisch einen Anstieg der ionisierten Silanole und damit eine erhöhte Bindeintensität. Bis zum jetzigen Zeitpunkt kann dies für die 6HB und tPads® bestätigt werden (Abbildung 32d). Die Pads weisen keine signifikanten Unterschiede im Bedeckungsgrad zwischen unbehandeltem und nach 1 modifiziertem Siliziumdioxid auf. Aufgrund der molekularen Struktur, dem geringen R_a -Wert und der erhöhten Dichte der Hydroxylgruppen wurde ein höherer Bedeckungsgrad erwartet. Damit entsprechen die Ergebnisse nur teilweise der Literaturrecherche, dass das Sauerstoffplasma die Bindeintensität erhöht. Andererseits sind diese Beobachtungen auch stark von der Art der Funktionalisierung und damit den gewählten Parametern abhängig (Pillers, Goss, & Lieberman, 2014) (Gopinath & Rothmund, 2014).

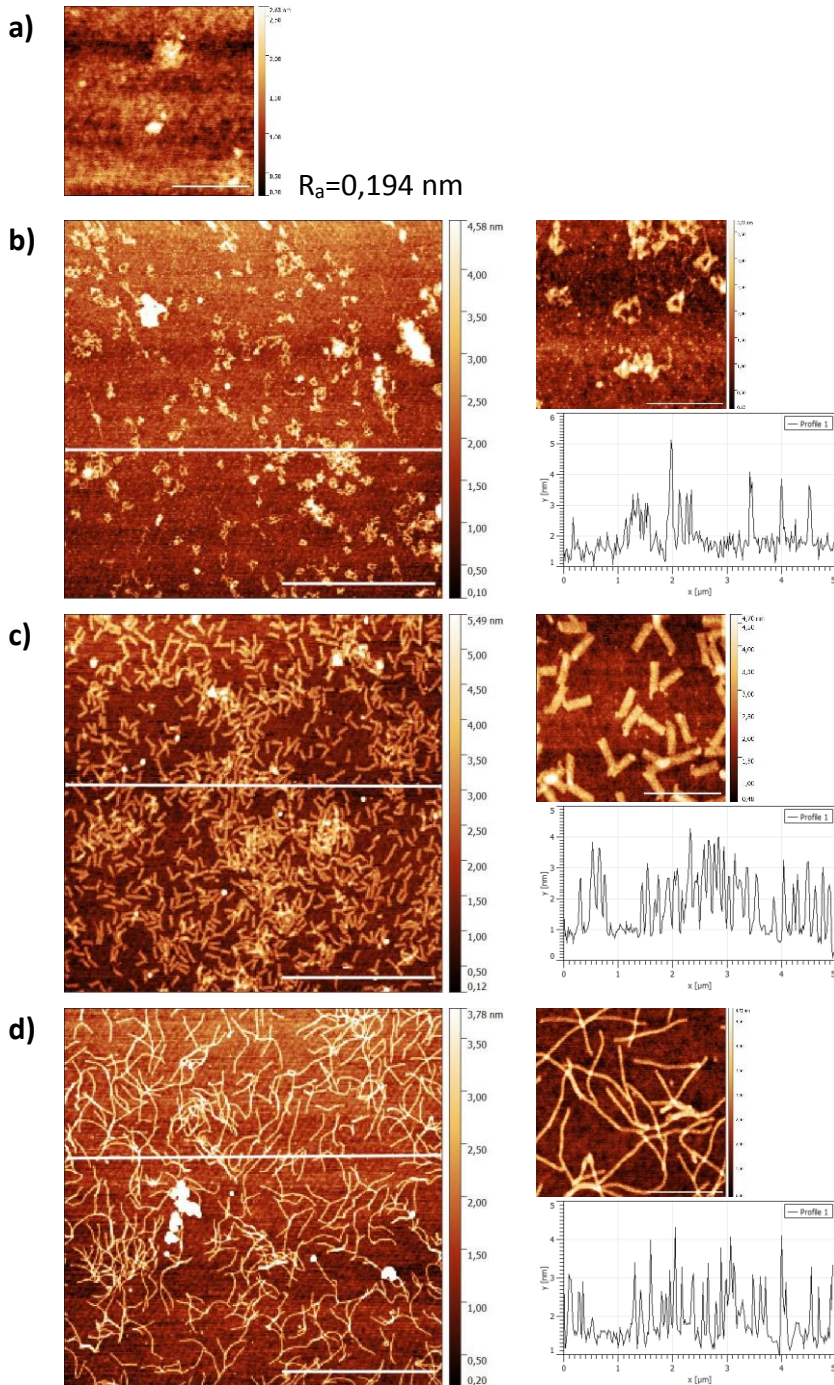


Abbildung 32: Immobilisierung der DNA-Origami auf Siliziumdioxid nach Modifikation 1

Gezeigt wird das a) pure Siliziumdioxid, die Immobilisierung der b) tPads®, c) Pads und d) 6HB auf Siliziumdioxid hinsichtlich der optischen/topographischen Darstellung unter Angabe des R_a -Wertes für das Substrat und des extrahierten Oberflächenprofils für den $5 \times 5 \mu\text{m}^2$ -Ausschnitt; Skala: $2 \mu\text{m}$, Detailaufnahmen: 400 nm .

Die tPads® weisen neben einem höheren Bedeckungsgrad nach Modifikation 1 Deformationen auf. Das trifft nur auf diesen Parametersatz zu. Es ist schwierig abzuschätzen, warum

dieses Phänomen auftritt, da die intrinsischen Spannungen der tPads® wahrscheinlich einen Einfluss auf die Immobilisierung haben. Eventuell entstehen ungeklärte Interaktionen zwischen der Oberfläche und den tPads®, sodass Deformationen und Selbstassemblierung entstehen (Sun, Ko, Zhang, Ribbe, & Mao, 2009) (Endo, Hidaka, & Sugiyama, 2011) (Hamada & Murata, 2009). Die Ausgangslösung zeigte sich auf den weiteren Oberflächen und auf der Mica-Referenz intakt.

Nach Modifikation 2 weist die Siliziumdioxidoberfläche einen Ra-Wert von 0,180 nm auf und ist damit 0,014 nm glatter als nach Modifikation 1 (Abbildung 33a). Demnach wird eine erhöhte Bindeintensität der DNA-Origami erwartet. Dies ist jedoch nur bei den 6HB zu beobachten. Sie bilden verstärkt und flächenmäßig begrenzt Aggregate (Abbildung 33d). Das zugehörige Höhenprofil zeigt einen erhöhten Bedeckungsgrad im Vgl. zu Modifikation 1 auf. Die tPads® liegen nach Modifikation 2 vollständig ausgeprägt ohne Deformationen vor. Sie bilden wie nach Modifikation 1 verstärkt Aggregate. Der Bedeckungsgrad ist annähernd gleich. Hingegen weisen die Pads im Vgl. zu Modifikation 1 eine erheblich geringe Bedeckung auf. Die Gründe für diese Beobachtungen sind ungeklärt. Basierend auf der Annahme, dass zweidimensionale und flächige DNA-Origami – in diesem Fall Pads und tPads® – bei gleichbleibendem Protokoll eine erhöhte Bindeintensität aufweisen, wurde dies nicht erwartet. Jedoch sind Abweichungen bei der Modifikation der Oberfläche nicht auszuschließen. Andere Untersuchungen haben ergeben, dass Störfaktoren in der Anlage für die Plasmaaktivierung die Immobilisierung erheblich beeinflussen – bis hin zur Nicht-Anlage.

Bezogen auf die Ausprägung und gleichbleibenden Bedeckungsgrad der tPads® und die erhöhte Bindeintensität der 6HB scheint Modifikation 2 für eine geplante Strukturierung nach *Helke et al.* geeigneter.

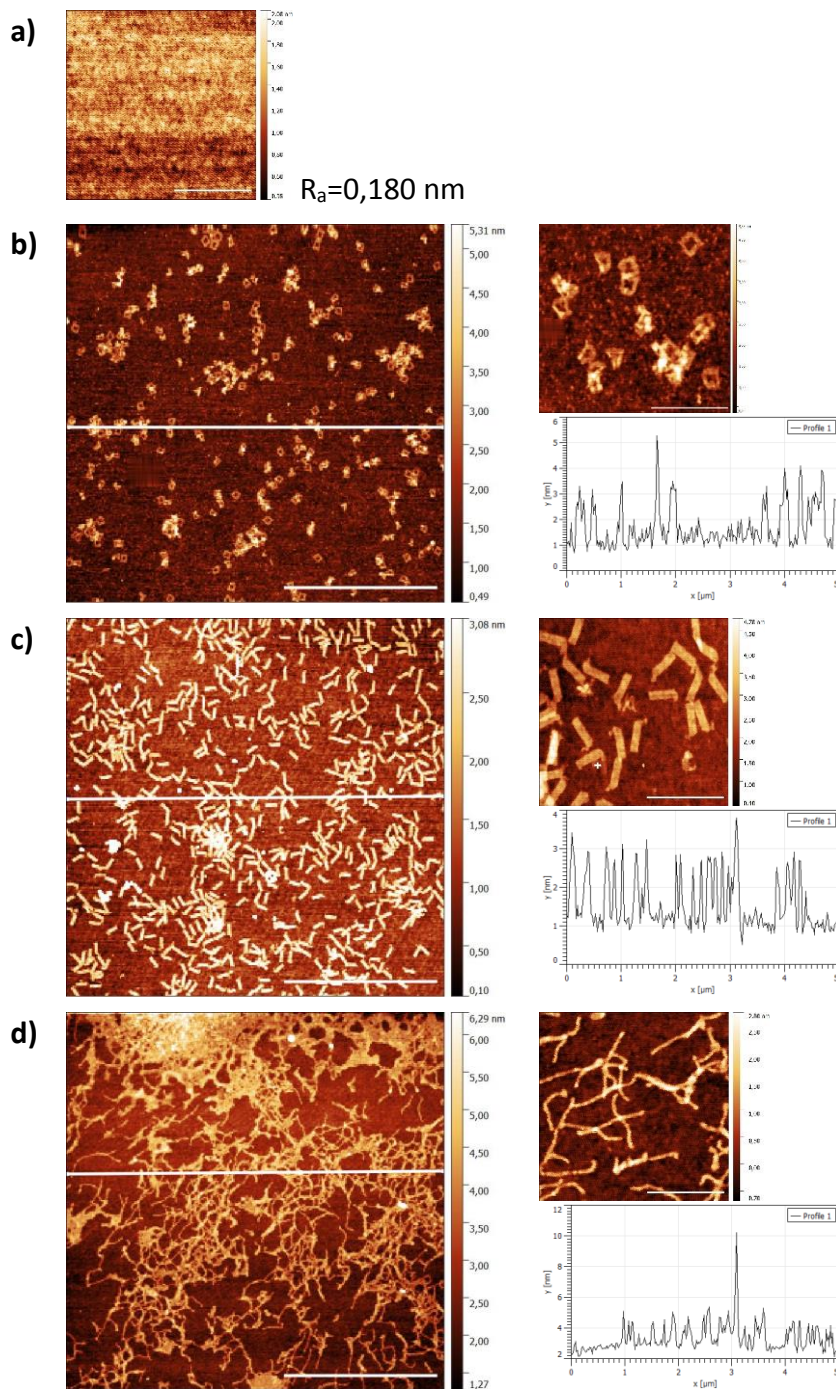


Abbildung 33: Immobilisierung der DNA-Origami auf Siliziumdioxid nach Modifikation 2

Gezeigt wird das a) pure Siliziumdioxid, die Immobilisierung der b) tPads®, c) Pads und d) 6HB auf Siliziumdioxid hinsichtlich der optischen/topographischen Darstellung unter Angabe des R_a -Wertes für das Substrat und des extrahierten Oberflächenprofils für den $5 \times 5 \mu\text{m}^2$ -Ausschnitt; Skala: $2 \mu\text{m}$, Detailaufnahmen: 400 nm .

Die Modifikation 3 entspricht den standardisierten Ätzparametern der Lithographie. Der R_a -Wert der Siliziumdioxidoberfläche beträgt nach dieser Plasmaaktivierung 0,188 nm (Abbildung 34a). Damit ist die Oberfläche wieder rauer als nach Modifikation 2. Dementsprechend wird ein geringerer Bedeckungsgrad und Bindeintensität erwartet als nach Modifikation 2. Dies kann für die zweidimensionalen Strukturen bestätigt werden. Abbildung 34 – die Immobilisierung der DNA-Origami auf Siliziumdioxid nach Modifikation 3 – ist auffällig bezogen auf den entstandenen Hintergrund. Jede Probe weist erhöhte kreisförmige Partikel auf, welche höher als die DNA-Origami-Strukturen erscheinen. Trotz eines niedrigen R_a -Wertes wurde partiell ein niedrigerer Bedeckungsgrad als bei Modifikation 1 und unmodifiziertem Siliziumdioxid erreicht. Bei diesem Parametersatz wurde die höchste Bindeintensität erwartet – die meisten Hydroxylgruppen, an die Magnesium und DNA-Origami binden können.

Generell kann festgestellt werden, dass die Sauerstoffplasma-Aktivierung eine erhöhte Bindeintensität der DNA-Origami forciert. So entstehen Hydroxylgruppen an der Siliziumdioxid-Oberfläche und damit Bindestellen für Magnesium und DNA-Origami. Die vermehrten Hydroxylgruppen bedingen eine höhere Dichte an negativen Ladungen wie bei *Pillers et al.* beschrieben. Jedoch ist keine lineare Abhängigkeit von den Parametersätzen für alle Strukturen zu beobachten, sondern lediglich Tendenzen auszumachen. Zudem scheinen die tPads® instabil. An den Ergebnissen wird sichtbar, dass nicht immer eine Übereinstimmung zur Literatur erreicht wird und unerwartete Beobachtungen gemacht werden können. Des Weiteren ist es schwierig die Ergebnisse genau zu reproduzieren, da die Messung selbst als Fehlerquelle auftreten kann und die Modifikationen sowie das Verhalten der DNA-Origami in Lösung ungeklärt ist.

Von den getesteten Parametersätzen scheint Modifikation 2 die geeignetste für die Herstellung der hydrophilen Kavitäten zu sein. Im Anschluss folgen die hydrophoben Oberflächen, die eine Anlagerung der DNA-Origami gemäß des Ansatzes nach *Helke et al.* verhindern sollen.

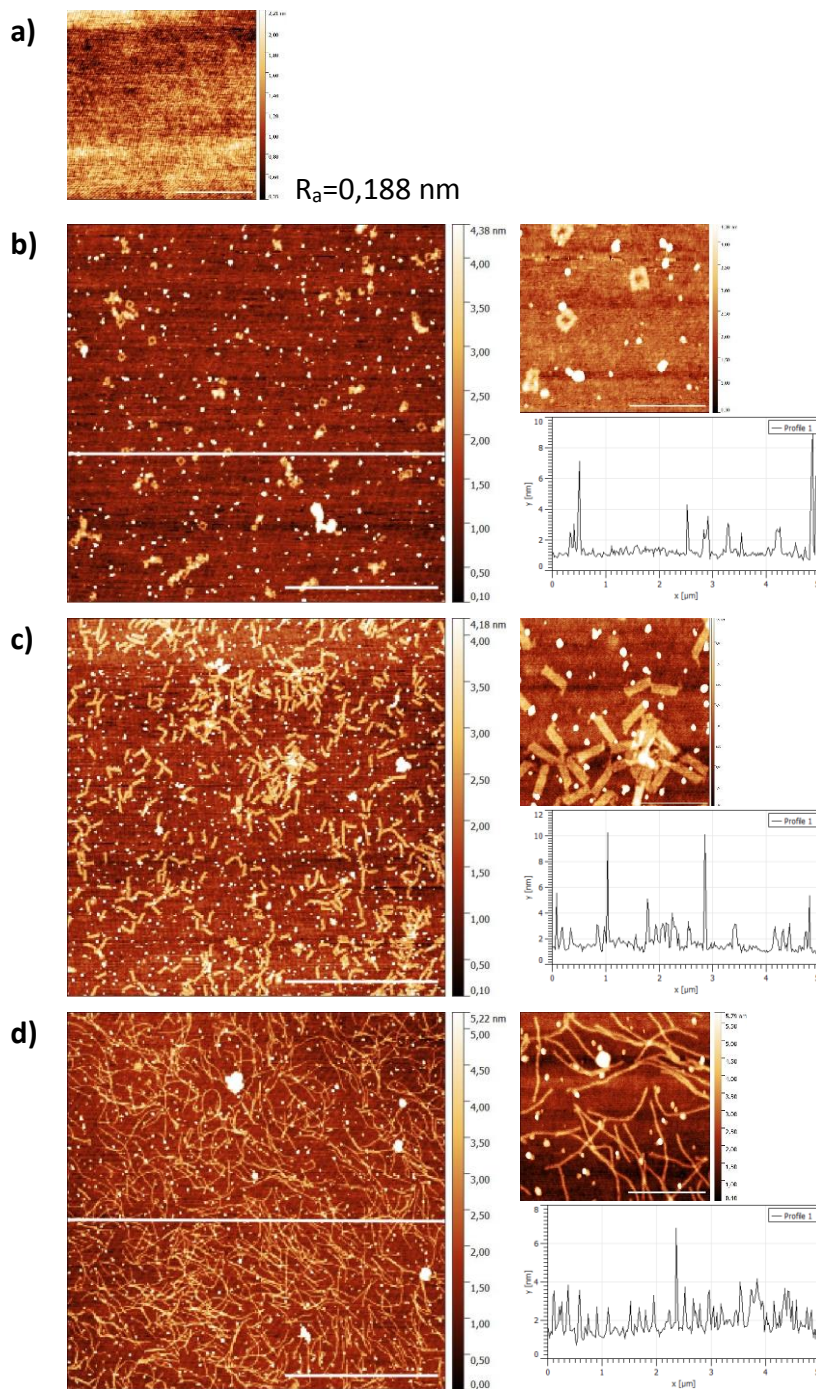


Abbildung 34: Immobilisierung der DNA-Origami auf Siliziumdioxid nach Modifikation 3

Gezeigt wird das a) pure Siliziumdioxid, die Immobilisierung der b) tPads®, c) Pads und d) 6HB auf Siliziumdioxid hinsichtlich der optischen/topographischen Darstellung unter Angabe des R_a -Wertes für das Substrat und des extrahierten Oberflächenprofils für den $5 \times 5 \mu\text{m}^2$ -Ausschnitt; Skala: $2 \mu\text{m}$, Detailaufnahmen: 400 nm .

6.1.3 DLC (Diamond like Carbon)

Bei DLC handelt es sich um ein hydrophobes Polymer, welches aufgrund der Hydrophobizität die DNA-Origami abweisen soll. Entgegen der Erwartung konnte eine Anlagerung mit einem hohen Bedeckungsgrad aller DNA-Origami beobachtet werden. Der R_a -Wert für die gemessene DLC-Oberfläche beträgt 0,175 nm (Abbildung 35a). Die Literatur gibt abweichende R_a -Werte von DLC-Filmen an, da diese von der Rauigkeit des darunterliegenden Substrates und der Film-Dicke sind. Je nach Parametersatz können sehr glatte Oberflächen mit einem Rauigkeitswert unter 0,4 nm realisiert werden (Nazarpour, 2014).

Damit ist DLC nach Mica die glatteste verwendete Oberfläche. Dies entspricht dem hohen Bedeckungsgrad und der damit einhergehenden hohen Bindeintensität (Gopinath & Rothmund, 2014). Die tPads® scheinen verformt (Abbildung 35b), nur wenige haben sich wie auch Mica oder Siliziumdioxid plan abgelegt oder es liegt ein Spitzenfehler vor. Diese Aufnahmen wurden durch die TU Dresden referenziert. Dieselbe Beobachtung trifft auf die Pads zu (Abbildung 35c). Die 6HB weisen bis auf die „Schneckenbildung“ keine Auffälligkeiten auf.

In weiterführenden Studien mit einer erhöhten bzw. ohne Spülung und mit geringerer Konzentration konnten die Ergebnisse wiederholt werden. Für das verwendete Substrat ist es reproduzierbar. Entgegen der Erwartung ist eine Anlagerung der DNA-Origami auf DLC – einer hydrophoben Oberfläche – sichtbar. Diese Beobachtung spricht dafür, dass nicht allein die Hydrophobizität einer Oberfläche eine Anlagerung bedingt, sondern auch die geringe Rauigkeit eine begünstigende Rolle spielt. Generell erreichen die DNA-Origami eine außerordentlich hohe Bedeckung auf DLC, aber die zweidimensionalen DNA-Origami sind zerstört. *Sun et al.* und *Hamada et al.* beschreiben eine Abhängigkeit der Oberfläche von der Selbstassemblierung (Sun, Ko, Zhang, Ribbe, & Mao, 2009) (Hamada & Murata, 2009). DLC scheint die Selbstassemblierung der zweidimensionalen DNA-Origami aufgrund ungeklärter Mechanismen negativ zu beeinflussen. Gleichzeitig entspricht diese Beobachtung der Literatur, dass die Immobilisierung von der molekularen Struktur der DNA-Origami abhängig ist (Woo & Rothmund, 2014). *Alloyeau et al.* beschreibt in seiner Veröffentlichung, dass sich DNA unzureichend auf hydrophoben Oberflächen anlagert (Alloyeau, Ding, Ramasse, & Kisielowski, 2011). Die zur Literatur teilweise konträren Ergebnisse werfen die

Frage auf, auf welchem zusätzlichen Mechanismus die Anlagerung auf DLC basiert und weshalb die 2D-Strukturen zerstört sind. Es wird angenommen, dass die Oberfläche mit der DNA-Lösung elektrostatische Wechselwirkungen eingeht, die die Anlagerung und gleichzeitig die Selbstassemblierung beeinflussen. Andererseits ist es möglich, dass sich das Material aufgrund der Lagerungszeit verändert hat, sodass eine Anlagerung basierend auf Hydroxylgruppen möglich wird.

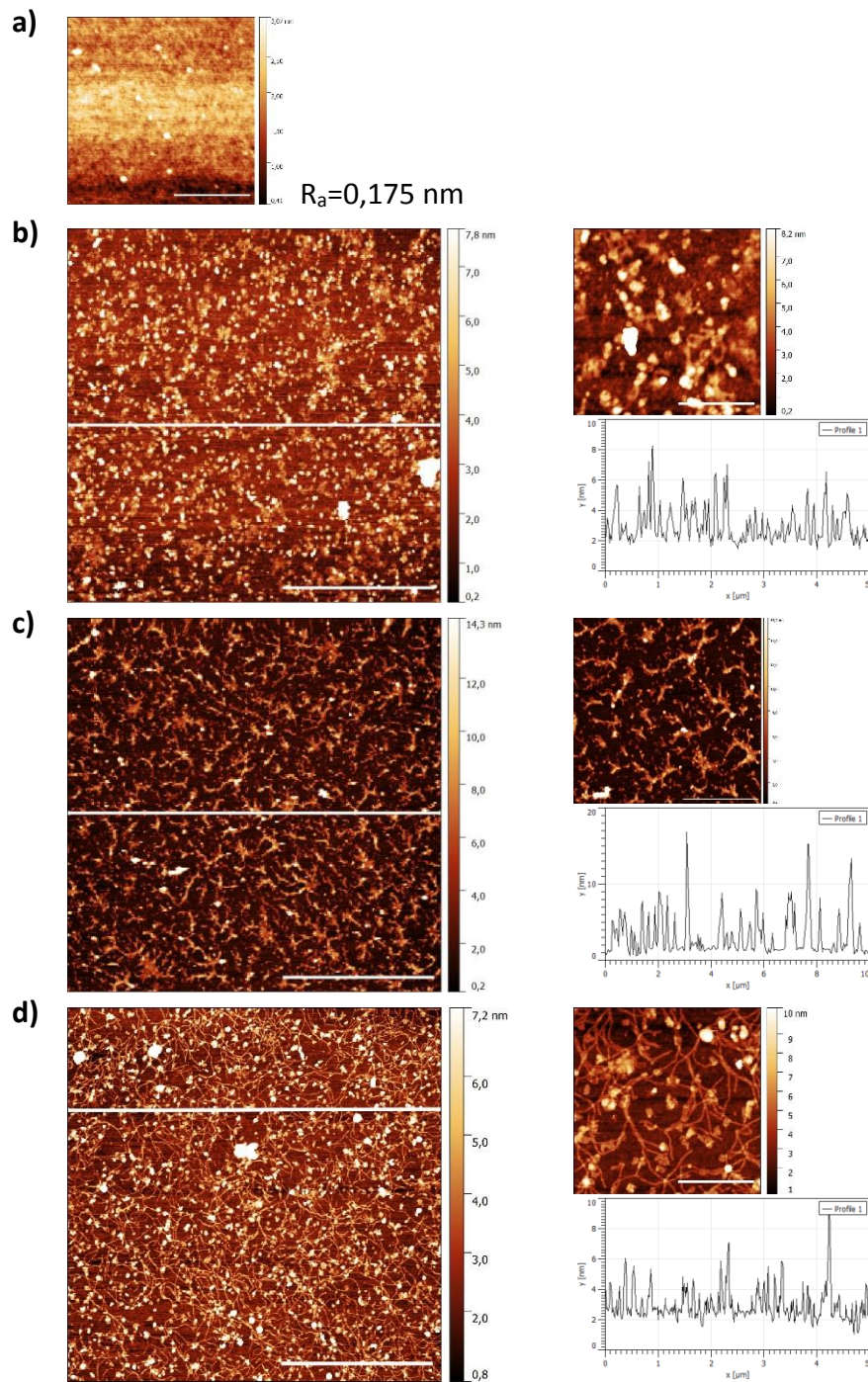


Abbildung 35: Immobilisierung der DNA-Origami auf DLC

Gezeigt wird das a) pure DLC, die Immobilisierung der b) tPads®, c) Pads und d) 6HB auf DLC hinsichtlich der optischen/topographischen Darstellung unter Angabe des R_a -Wertes für das Substrat und des extrahierten Oberflächenprofils für den $5 \times 5 \mu\text{m}^2$ -Ausschnitt; Skala: $2 \mu\text{m}$, Detailaufnahmen: 400 nm .

6.1.4 CF (Carbon-Fluorid)

Das CF-Polymer soll neben DLC entsprechend des zu prüfenden Integrationsansatzes für DNA-Origami eine abweisende Schicht aufgrund der Hydrophobizität bilden. Das CF-Polymer weist einen R_a -Wert von 0,547 nm auf und ist demnach 0,372 nm rauer als DLC. Die Literatur gibt einen R_a -Wert von ca. 0,4 nm an (Terriza, et al., 2012). Demnach ist das vorliegende Polymer rauer, sodass eine geringe Bedeckung erwartet wird. Dies trifft auf den Zeitpunkt nach der Spülung zu, jedoch nicht davor. Weiterführende Untersuchungen zeigten eine Ausrichtung der Strukturen in Spülrichtung. Dies legt nahe, dass unspezifische Bindungen vorliegen, die eventuell durch eine Optimierung des Spülvorganges entfernt werden können. Starke ionische Wechselwirkung wie sie zwischen DNA, Magnesium und den Hydroxylgruppen entstehen, können nicht weggespült werden. Daher ist davon auszugehen, dass ein anderer bisher ungeklärter Anlagerungsmechanismus vorliegt.

Die geringe Bedeckung in Richtung der Spülung weisen CF als das geeignetere Polymer für die Nichtanlagerungsbereiche aus.

Im folgenden Kapitel erfolgen Tests an HMDS, welches in der Literatur oftmals als DNA-Origami abweisende Schicht eingesetzt wird.

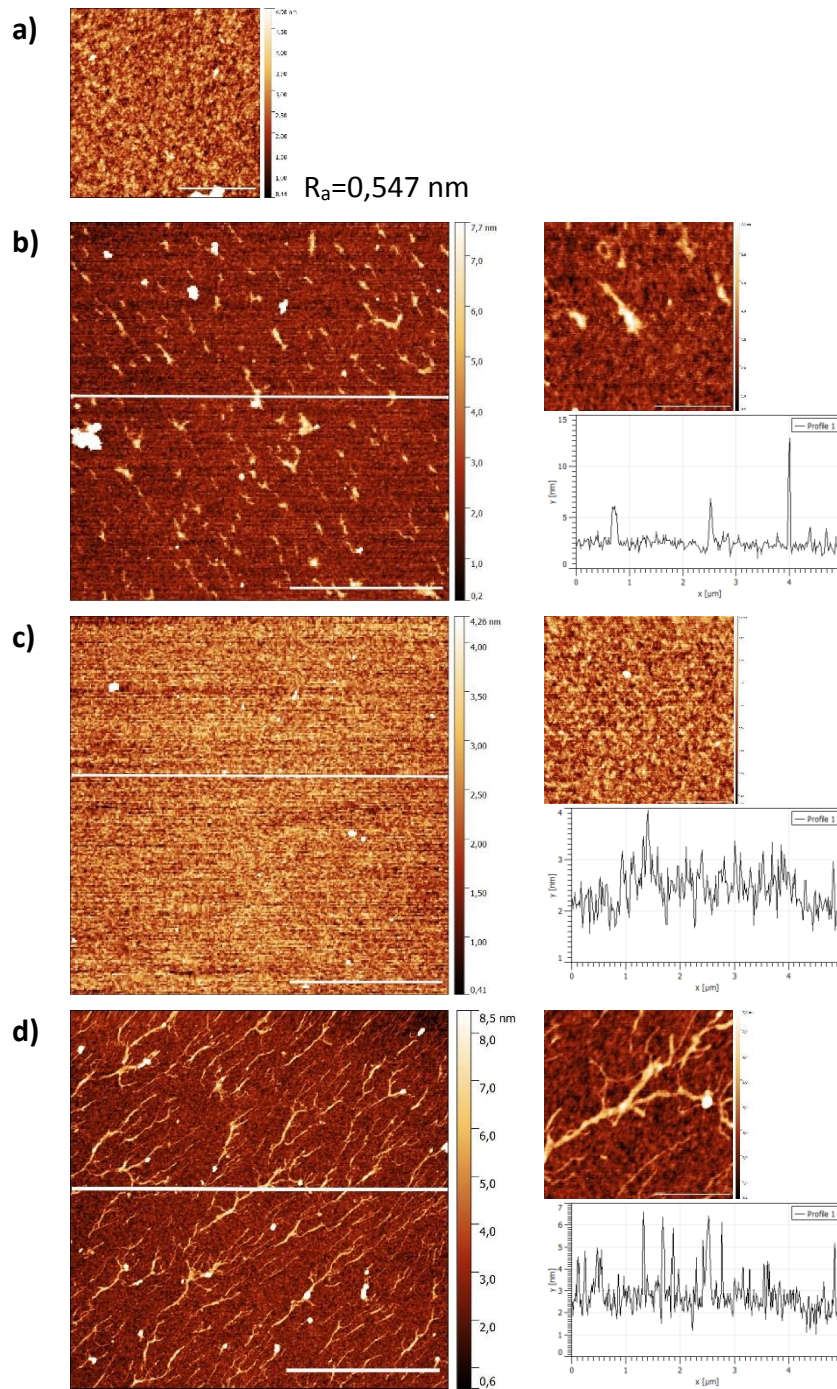


Abbildung 36: Immobilisierung der DNA-Origami auf CF

Gezeigt wird das a) pure DLC, die Immobilisierung der b) tPads®, c) Pads und d) 6HB auf DLC hinsichtlich der optischen/topographischen Darstellung unter Angabe des R_a -Wertes für das Substrat und des extrahierten Oberflächenprofils für den $5 \times 5 \mu\text{m}^2$ -Ausschnitt; Skala: $2 \mu\text{m}$, Detailaufnahmen: 400 nm

6.1.5 HMDS (Hexamethyldisilazan)

HMDS wurde bei *Gopinath und Rothmund* und *Kershner et al.* als Nicht-Anlagerungsschicht genutzt. Es hat jedoch den Nachteil, dass es flüchtig ist und keine 2D-Kavitäten geschaffen werden können. Von daher ist es für den Integrationsansatz nach Helke et al. irrelevant und dient ausschließlich dem Vergleich mit der Literatur. Abbildung 37 zeigt die Immobilisierung der DNA-Origami auf einer HMDS-Oberfläche. Die HMDS-Beschichtung auf der Siliziumdioxidoberfläche weist einen R_a -Wert von 0,410 nm auf (Abbildung 37a). Es liegt bezüglich seiner Rauigkeit zwischen dem rauen CF und dem glatteren DLC. Demnach wird ein Bedeckungsgrad erwartet, der sich dazwischen einreicht. Es wird ersichtlich, dass sich die Strukturen in geringem Ausmaß und ohne Beeinträchtigung ihrer Form entlang der Spülrichtung ablagern. *Kershner et al.* geben an, dass die Methylgruppen der HMDS-Oberfläche die DNA-Origami abweisen, indem Magnesium zwar an das Phosphatrückgrat, aber nicht an die Substratoberfläche binden kann. Es handelt sich hierbei um eine chemische Wechselwirkung. Das wiederum zeigt, dass die Anlagerung der DNA-Origami neben der Substratfunktionalisierung, der Rauigkeit des Substrates auch von der chemischen Zusammensetzung einer Oberfläche abhängig ist.

Abbildung 37d weist breitere Strukturen und entstandene Schatten auf. Hierbei handelt es sich um eine Doppelspitze am *Cantilever*.

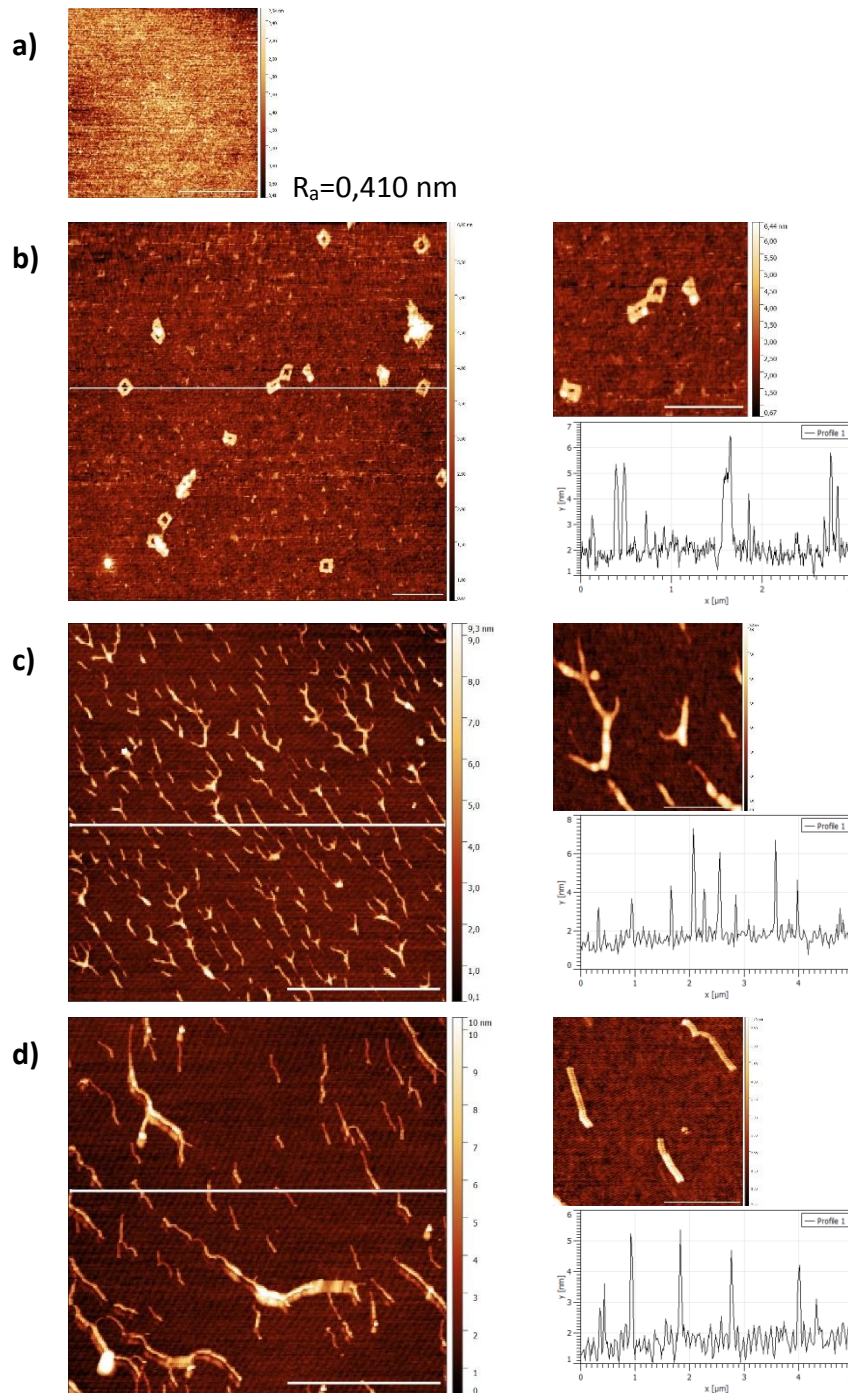


Abbildung 37: Immobilisierung der DNA-Origami auf HMDS

Gezeigt wird das a) pure DLC, die Immobilisierung der b) tPads®, c) Pads und d) 6HB auf HMDS hinsichtlich der optischen/topographischen Darstellung unter Angabe des R_a -Wertes für das Substrat und des extrahierten Oberflächenprofils für den $5 \times 5 \mu\text{m}^2$ -Ausschnitt; Skala: $2 \mu\text{m}$, Detailaufnahmen: 400 nm .

6.1.6 Auswertung des Ansatzes nach *Helke et al.*

Das Ziel dieses Unterkapitels ist der Vergleich der Oberflächen und die Bewertung des Ansatzes von *Helke et al.* gemäß der Verstärkung des Polaritätsunterschiedes. Die Ergebnisse verdeutlichen, dass eine getrennte Betrachtung der Immobilisierung der DNA-Origami auf hydrophilen und hydrophoben Oberflächen sinnvoll ist.

Der Vergleich von unbehandeltem SiO₂ und den Modifikationen 1-3 mit Sauerstoffplasma verdeutlicht den Anstieg der Bindeintensität von DNA-Origami. Dabei wird die höchste und zerstörungsfreieste Bedeckung bei Modifikation 2 (5 min, 800 Watt (2,45 GHz), 450 sccm O₂, ca. 1 mbar) erreicht. Gleichzeitig weist diese Oberfläche auch den niedrigsten R_a-Wert mit 0,180 nm auf. Diese Beobachtungen untermauern die These der steigenden Bindeintensität mit abnehmender Oberflächenrauigkeit (Gopinath & Rothmund, 2014). Mit den Ätzparametern nach Modifikation 2 wird in dieser Arbeit die dichteste und formstabilste Anlagerung erreicht und demnach kann der Parametersatz 2 für die Strukturierung der Wafer in Zukunft übernommen werden. Der Parametersatz schafft eine glatte Oberfläche, welche eine hohe Dichte an Hydroxylgruppen und damit ein hohe magnesium-basierte Bindeintensität der DNA-Origami aufweist. Jedoch ist bei der Plasmaaktivierung nicht abschätzbar, inwiefern sich eine intensive Anlagerung auf multiple Bindungen auswirkt. Dies ist Gegenstand weiterführender Untersuchungen.

Entgegen der Erwartung konnten auch auf den hydrophoben Oberflächen DNA-Origami abgeschieden werden. Die Bedeckung ist umso höher, je niedriger der R_a-Wert der Oberfläche ist. Es wurde auf CF und HMDS eine DNA-Origami-abweisende Funktion festgestellt. HMDS weist Methylgruppen auf, an denen Magnesium und DNA-Origami nicht binden können. Sowohl CF als auch HMDS besitzen eine raue Oberfläche, die diese Funktion unterstützt. Hingegen weist DLC eine glattere Oberfläche als modifiziertes Siliziumdioxid auf. Es wird davon ausgegangen, dass der hohe Bedeckungsgrad darauf basiert. Jedoch erscheinen die 2D-Strukturen zerstört und die vorliegende Arbeit geht davon aus, dass elektrostatische Wechselwirkungen in Abhängigkeit der Oberfläche vorherrschen, sodass eine Beeinflussung der Selbstassemblierung anzunehmen ist. Darauf geht Kapitel 6.2 ein.

CF ist als Nicht-Anlagerungsschicht vorzuziehen. Denn im Gegensatz zu HMDS ist es nicht flüchtig und es können vertiefte Kavitäten erstellt werden. Des Weiteren positionieren sich

die Strukturen auf CF und eventuell auch auf HMDS entlang der Spülrichtung. Dieses Verhalten kann in der Zukunft ausgenutzt werden, um eine präzise Anlagerung der Strukturen zu forcieren.

Des Weiteren kann festgehalten werden, dass die DNA-Origami-Strukturen bei gleichbleibendem Protokoll in unterschiedlicher Ausprägung sowohl auf hydrophilen als auch auf hydrophoben Oberflächen haften. Es werden Abhängigkeiten hinsichtlich der molekularen Struktur, der Rauigkeit der Oberfläche und der Substratfunktionalisierung ersichtlich. Die Hydrophobizität einer Oberfläche ist nicht der alleinige Einflussfaktor der DNA-Origami-Immobilisierung.

Hinsichtlich der Stabilität weisen die tPads® Defizite auf, sodass davon ausgegangen werden kann, dass mit der aktuellen Konstruktion keine mikrofluidische Integration stattfinden kann. Dafür müssen die Strukturen eine außerordentliche Stabilität aufweisen, die bis zum jetzigen Zeitpunkt nur für die 6HB zutrifft.

6.2 Oberflächenpotential

Da die in 6.1 präsentierten Ergebnisse bezüglich der Immobilisierung der DNA-Origami auf den hydrophoben Oberflächen teilweise ungeklärt, die 2D-Strukturen auf DLC zerstört sind und die Literatur auf die Ladungsdichte der Oberflächen hinweist, wird das Oberflächenpotential mittels KPFM gemessen. Denn Ladungsdichte und Oberflächenpotential korrelieren direkt miteinander (Kleiner, 2012). Dieses Kapitel charakterisiert die Immobilisierung der DNA-Origami beeinflusst durch das Oberflächenpotential der hydrophoben Oberflächen, die eine Nichtanlagerungsschicht laut des in 2.5.1 vorgestellten Ansatzes bilden sollen. Die Messungen des Oberflächenpotentials werden auf PMMA, DLC, hydrophobem und hydrophilen CF und Mica durchgeführt. Dabei dient Mica als Referenz für eine Oberfläche mit den optimalen Eigenschaften für die Immobilisierung von DNA-Origami. PMMA wird herangezogen, da es weitgehend neutral geladen ist und eine gute Ladungsspeicherung in Hinblick auf weiterführende Experimente mit der Nanoxerographie aufweist. CF und DLC werden gemessen, da CF ohne Spülung eine hohe Bedeckung aufzeigt und die 2D-Origami-Strukturen auf DLC verformt sind.

In Abbildung 38 sind die Messungen des Oberflächenpotentials abgebildet. Mica als hydrophile Oberfläche weist ein positives Oberflächenpotential von + 0,5 bis + 1,7 V auf. Das Oberflächenpotential der gemessenen PMMA-Schicht auf Silizium bewegt sich mit - 0,143 bis +0,262 V im neutralen Bereich. Im Gegensatz dazu zeigen die Messungen der hydrophoben CF- und DLC-Oberfläche, dass ein negatives Potential anliegt. Bei dem hydrophoben CF-Polymer wurde ein lokales Oberflächenpotential zwischen - 0,588 und - 0,340 V, bei dem hydrophilen CF eines + 0,213 bis + 0,775 V und bei DLC eines im Bereich von - 1,131 bis - 0,681 V gemessen.

Die CF-Oberfläche mit einem höheren R_a -Wert und einem mittleren Oberflächenpotential von von - 0,464 V weist die DNA-Origami eher ab als DLC mit einem niedrigeren R_a -Wert und einem mittleren Oberflächenpotential von - 0,906 V (Vgl. 6.1).

Bisher wurde die Bindung der DNA-Origami an hydrophoben Oberflächen und die vorherrschenden Mechanismen in der Literatur nur als Randerscheinungen beschrieben. Denn es wird davon ausgegangen, dass die magnesium-basierte Anlagerung auf den vorhandenen Hydroxylgruppen beruht.

Diese Messungen sind ein erster Anhaltspunkt dafür, dass die elektrostatischen Wechselwirkungen einer Oberfläche einen Einfluss auf die Immobilisierung und Selbstassemblierung der DNA-Origami haben könnten. Je niedriger das Potential der gemessenen hydrophoben Oberflächen, umso intensiver ist die Bindung, aber es besteht auch die Möglichkeit der Selbstassemblierung. Ausgehend von dieser Beobachtung wird angenommen, dass die Immobilisierung und die entsprechende Bindeintensität nicht nur auf der Hydrophobizität der Oberfläche basieren. Weiterführende Untersuchungen zeigten, dass die verwendeten Substrate – hydrophobes CF, DLC und PMMA – einen ähnlichen Kontaktwinkel aufweisen, jedoch verschieden große negative Potentiale. Mittels der KPFM-Messungen konnte also nachgewiesen werden, dass das Oberflächenpotential und das Maß der Hydrophobizität unabhängig voneinander sind und so eigene Parameter darstellen. Hydrophobe Oberflächen weisen ein negatives und hydrophile ein positives Oberflächenpotential auf.

In Hinblick auf die Deposition von Nano-Objekten mittels Nanoxerographie kann vermutet werden, dass unterschiedliche Mechanismen der Bindung bei hydrophilen/hydrophoben Oberflächen vorliegen. Während die Bindung der DNA-Origami auf hydrophilen Oberflä-

chen auf der Rauigkeit, dem Magnesiumgehalt und der Dichte der Hydroxylgruppen basieren, bildet das negative Oberflächenpotential der hydrophoben Oberflächen einen wichtigen Einflussfaktor. Hier liegt ein elektrostatisches Feld vor, welches das Wasser der Lösung anzieht. Das Wasser verdunstet und die DNA-Origami lagert sich an. Das erklärt die intensive Anlagerung der DNA-Origami an DLC, da hier das negativere Potential anliegt. Gleichzeitig erscheinen die zweidimensionalen DNA-Origami – Pads und tPads® – bei einem Oberflächenpotential von ca. -0,9 V entfaltet. Das untermauert zum einen die Abhängigkeit der Immobilisierung von der molekularen Struktur (Woo & Rothmund, 2014), da die 6HB intakt sind und andererseits gibt dies einen Hinweis darauf, dass die Selbstassemblierung von elektrostatischen Feldern abhängig ist. Hierbei kommt eine unspezifische Bindung zum Tragen, die durch einen Spülvorgang gelöst werden sollte wie bei der CF-Oberfläche.

Die Messungen und die daraus gezogenen Schlüsse gelten in erster Linie für das im Rahmen dieser Arbeit verwendete Material. Inwieweit dies allgemeingültig ist, konnte nicht geklärt werden. Hierfür müssen Materialstudien durchgeführt werden, welche die Abhängigkeit des Oberflächenpotentials von der Lagerungsdauer und –art klären. Theoretisch können auch ungeklärter Weise OH-Gruppen entstehen. Des Weiteren sind die Einflussfaktoren auf die Immobilisierung so komplex, dass nicht genau abgeschätzt werden kann, wo genau eventuelle Fehler liegen könnten. Mit dem gleichen Versuchsaufbau und Substrat konnten die Ergebnisse hinsichtlich der Form der DNA-Origami reproduziert werden.

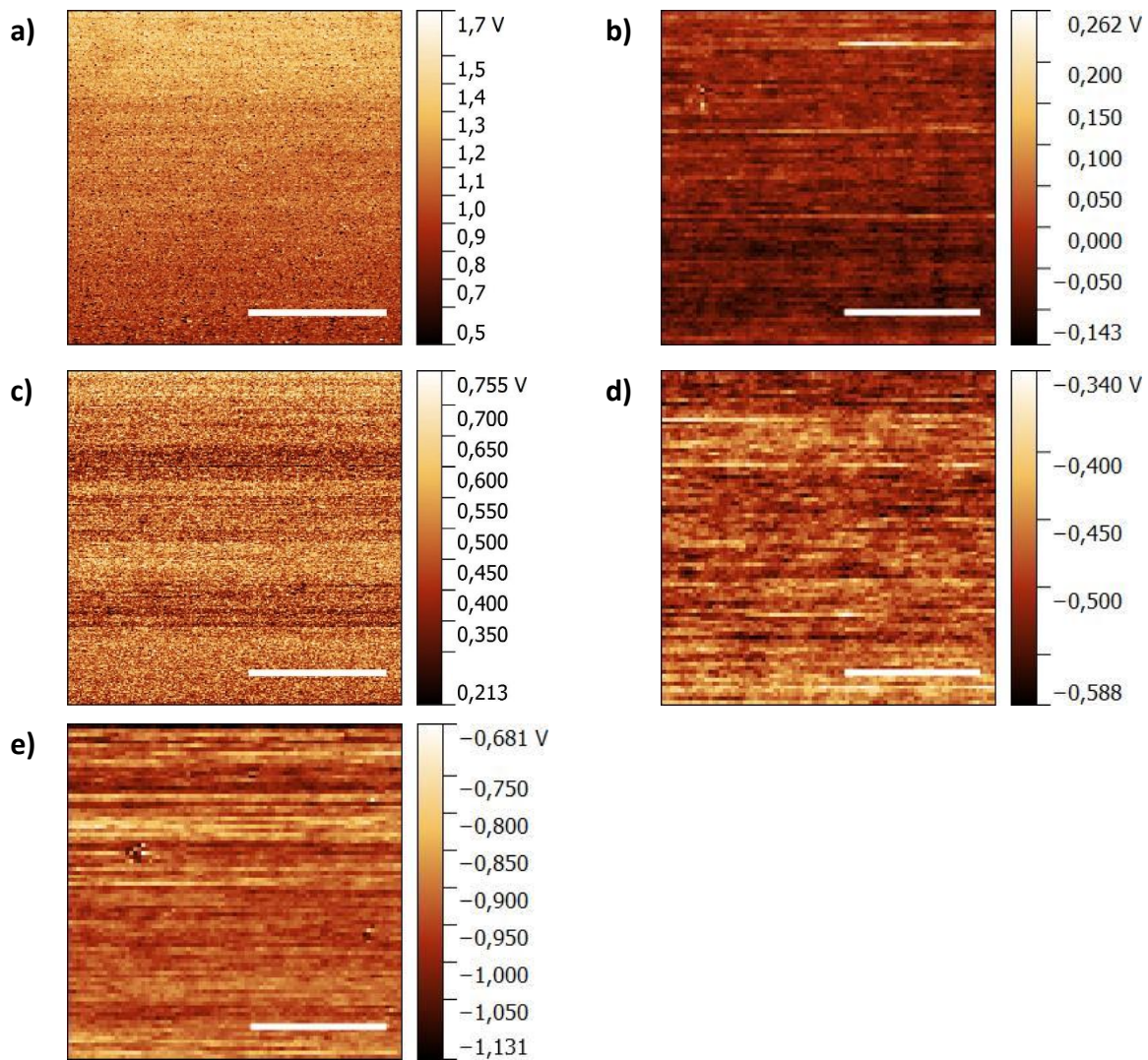


Abbildung 38: KPFM-Messungen

Abgebildet sind die Messungen des Oberflächenpotentials auf a) Mica, b) PMMA, c) hydrophilem CF, d) hydrophobem CF und e) DLC (Skala: 2 μm).

6.3 Molekularer *Lift-off*

Da die vorhergehenden Ergebnisse zeigen, dass sich DNA-Origami nicht nur auf hydrophilen, sondern in unterschiedlicher Ausprägung auch auf hydrophoben Oberflächen wie DLC, CF und HMDS anlagern, ist es notwendig eine alternative Technik zur Immobilisierung von DNA-Origami zu etablieren.

Die Grundidee des molekularen *Lift-offs* ist folgende: Der Wafer wird strukturiert, aber der Lack wird erst abgelöst, nachdem die DNA-Origami-Strukturen in den hydrophilen Kavitäten immobilisiert wurden. Um die Immobilisierung nicht aufzuheben und die Strukturen nicht zu schädigen, ist es unerlässlich den Lack biokompatibel zu entfernen. Hierfür werden DNA-Origami hinsichtlich der Stabilität gegenüber möglichen Detergenzien getestet, welche sich zum Entfernen eines Lacks eignen könnten. *Kim et al.* geben in einer Publikation eine Formstabilität der Origami-Strukturen gegenüber: 10 minütiger Hitze bis 200°C, sowie Eintauchen in einer Vielzahl von organischen Lösungsmitteln bis zu 24 h, kurze Exposition gegenüber alkalischen wässrigen Lösungen und 5 min UV/O₃ an. In Zusammenarbeit mit dem ZfM kann ein Lack zur Verfügung gestellt werden, der sich mittels einer 2%-igen Natriumhydroxidlösung entfernen lässt. Daraufhin wird dies getestet. Aufgrund der Eigenschaften der DNA wird nicht davon ausgegangen, dass der *Lift-off* mittels NaOH realisiert werden kann, da die DNA im stark basischen Bereich denaturiert.

Erste Tests werden mit einer 2%-igen Natriumhydroxidlösung, DI-Wasser, Isopropanol und Aceton unter mechanischer Einwirkung durchgeführt. Die tPads® (3nM) werden auf Mica 10 min bei Raumtemperatur inkubiert, mit 200-300 µl millipore-Wasser gespült und anschließend einem Strahl mit hohem Druck des Detergens ausgesetzt (außer NaOH).

Die tPads® sind nach der Spülung defekt. In Abbildung 39a wurde die Probe mit NaOH gespült. Es ist ein erhöhtes Höhenprofil und deformierte Strukturen zu sehen. Der ermittelte pH-Wert der 2%-igen Natriumhydroxidlösung beträgt 13. In diesem pH-Bereich werden die Nukleobasen deprotoniert, die Wasserstoffbrücken aufgelöst und somit denaturiert die DNA. Das war zu erwarten, denn *Kim et al.* geben eine Stabilität bis zu einem pH von 11 an. Mechanische Einwirkungen sind in den folgenden Untersuchungen nicht auszuschließen. Sowohl DI-Wasser, NaOH als auch Aceton bewirken unter mechanischer Einwirkung eine Deformation der DNA-Origami. Diese Beobachtungen sind bis auf die Einwirkung von NaOH

konträr zur Literatur, die eine Stabilität von DNA-Origami gegenüber organischen Lösungsmitteln und DI-Wasser angibt (Kim, Surwade, Powell, O'Donnell, & Liu, 2014). Jedoch muss beachtet werden, dass eine mechanische Einwirkung bei kurzer Exposition stattfand. Es ist anzunehmen, dass die mechanische Einwirkung bei DI-Wasser und Aceton einen negativen Einfluss auf die molekulare Struktur der tPads® nimmt. Im Gegensatz dazu zeigt die Isopropanolprobe einzelne, intakte tPads® bei einem ausgeprägtem Hintergrund (Abbildung 39).

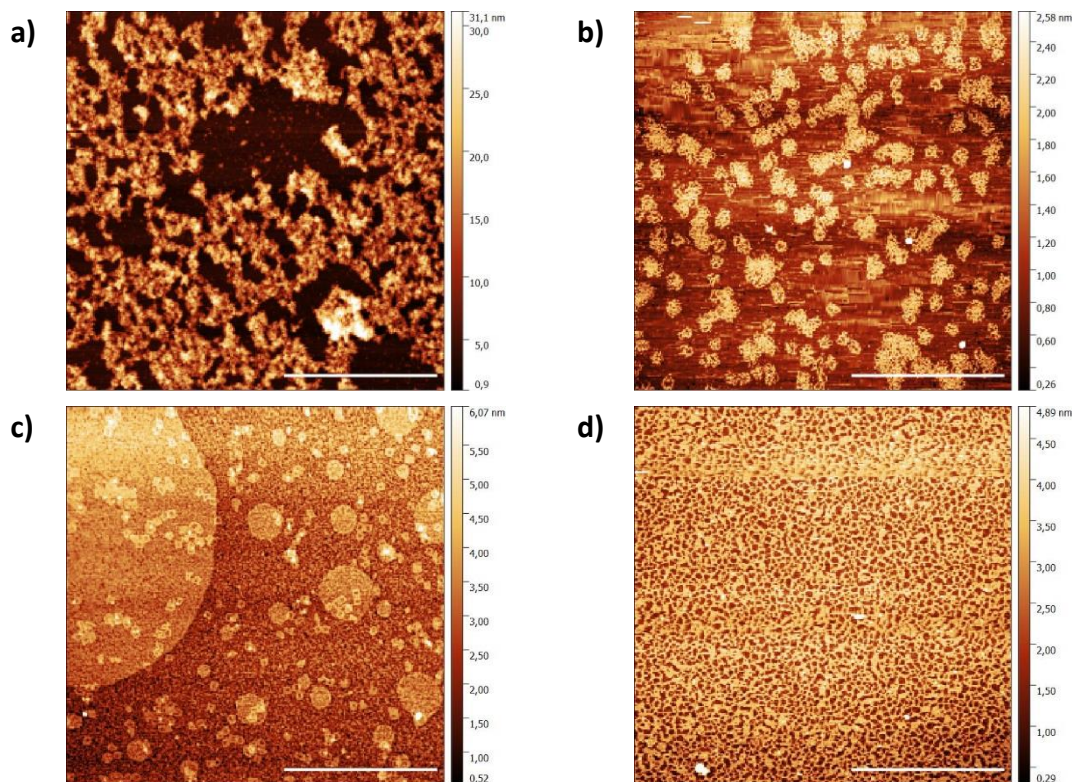


Abbildung 39: Stabilität der tPads® unter mechanischer Einwirkung gegenüber verschiedenen Detergenzien für einen molekularen Lift-off

Die AFM-Aufnahmen zeigen je 5 x 5 µm² Ausschnitte (Skala: 2 µm) der auf Mica immobilisierten tPads® nach mechanischer Spülung mit a) NaOH, b) DI, c) Isopropanol und d) Aceton.

Diese Ergebnisse werfen die Frage nach dem Anteil der mechanischen Belastung auf. Aus diesem Grund wird der Versuchsaufbau anders gestaltet und die auf Mica immobilisierten tPads® 10 Sekunden in das jeweilige Detergens eingetaucht (Abbildung 40). Hierbei fehlt aufgrund sehr starker Salzbildung die Aufnahme der Probe, die in NaOH eingetaucht wurde. Es ist anzunehmen, dass auch in diesem Fall die tPads® denaturiert vorliegen. Denn im vorherigen Test lag hierbei keine mechanische Einwirkung vor.

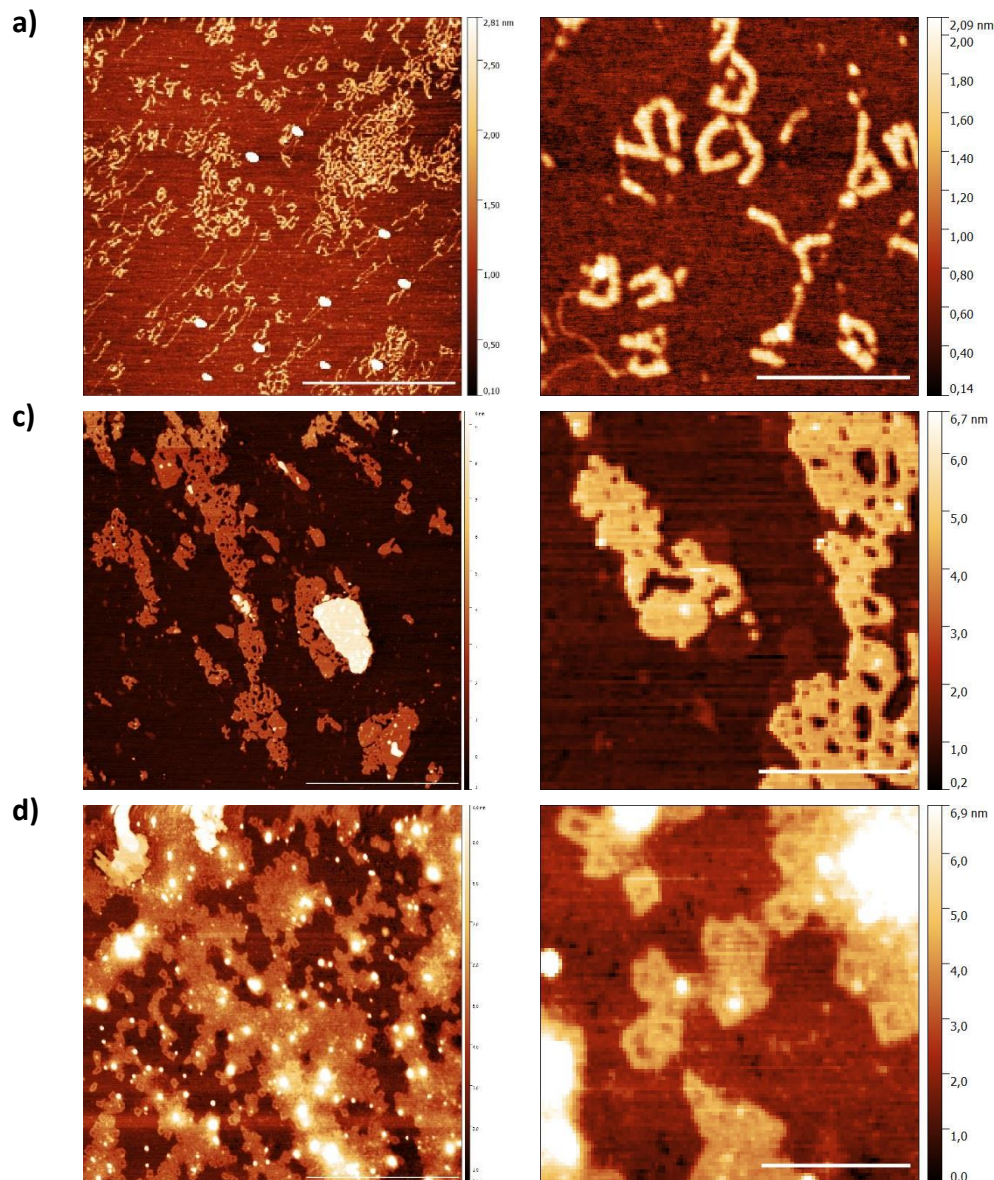


Abbildung 40: Stabilität der tPads® gegenüber verschiedenen Detergenzien für einen molekularen Lift-off

Die AFM-Aufnahmen zeigen je $5 \times 5 \mu\text{m}^2$ und $1 \times 1 \mu\text{m}^2$ Ausschnitte der auf Mica immobilisierten tPads® nach 10 sec Eintauchen in a) DI, b) Isopropanol und c) Aceton.

Das Eintauchen der Probe in DI-Wasser zerstört den Rahmen der tPads® und die Ablösung der Bindung an Mica. Die vorliegende Arbeit geht davon aus, dass die Stabilität der getesteten tPads® nicht ausreicht. Dies konnte schon in den vorhergehenden Studien beobachtet werden. Wahrscheinlich ist diese Instabilität in der fehlenden Basenkorrektur und in den damit einhergehenden intrinsischen Spannungen begründet.

Das Eintauchen in Isopropanol führt zur Aggregation der tPads® und zur Deformation. In Aceton scheinen die tPads® jedoch intakt und auf der Oberfläche fixiert.

Die Ergebnisse sind nicht nur durch die mechanische Einwirkung entstanden, wurden dadurch aber verschlechtert. Die chemischen Reaktionen spielen die Hauptrolle. Der molekulare *Lift-off* der tPads® scheint nur ohne mechanische Einwirkung in Aceton umsetzbar zu sein.

Diese Ergebnisse sind ein Anhaltspunkt dafür, dass die molekulare Struktur bei der Stabilität und Immobilisierung eine entscheidende Rolle spielt. Eventuell ist der molekulare *Lift-off* für die Pads oder 6HB besser realisierbar.

6.4 Elektrostatische Felder

Die erfolgte Anlagerung der DNA-Origami auf hydrophoben Oberflächen mit einem negativen Oberflächenpotential (Ergebnisse aus 6.1 und 6.2) lassen auf eine mögliche Positionierung der DNA-Origami mittels elektrostatischer Potentiale schließen. Dafür wird die Methode der Nanoxerographie und EDL genutzt. Die Nanoxerographie ist eine Strukturierungsmethode. Sie baut auf den Oberflächenpotentialunterschieden zwischen AFM-Spitze und dem Substrat auf, um ein Muster negativer Ladungen in ein nicht leitfähiges Substrat zu schreiben.

Erste Untersuchungen finden mit Lachsspermien-DNA und auf PMMA/SiO₂ statt (Abbildung 41). Mittels CM und einer angelegten Spannung von +20 V an der Stage wurde ein Feld mit den Abmaßen von 15 x 15 µm² des Substrates negativ aufgeladen. Die Messung ergab ein lokales Oberflächenpotential von -4,1 V im Feld und 2,3 V in der Umgebung (Abbildung 41a). Der Potentialunterschied beträgt 6,4 V: Nach dem Eintauchen in die Emulsion fallen die Potentiale ab. Das Umgebungspotential beträgt 1,18 V und das lokale Oberflächenpotential des eingeschriebenen Feldes -0,2 V (Abbildung 41b). Vereinzelte Bereiche der Tröpfchenanlagerung weisen ein Oberflächenpotential von ca. -1 V auf. Das Feld ist aufgrund des Driftes verzogen und die Ladung diffundiert in die umgebenden Bereiche. In diesem Versuch konnte nachgewiesen werden, dass PMMA die Ladung für zwei bis drei Stunden speichert. Die Literaturangaben hierzu sind nicht einheitlich.

Die Anlagerung der Tropfen ist topographisch detektierbar im Bereich des negativen Feldes (Abbildung 41c). Die Anlagerung ist demnach selektiv. Laut Theorie werden die Biomole-

küle in die Tropfen eingebettet und lagern sich dann aufgrund der Van-der-Waals-Wechselwirkungen selektiv an (Mesquida & Blanco, 2010). Die Tröpfchenanlagerung kann beobachtet werden, aber die eindeutige Detektion der Lachsspermien-DNA gestaltet sich schwierig. Die Partikel in Abbildung 41c weisen eine Höhe von über 100 nm auf (Abbildung 41d). Dabei sind im Randbereich der Partikel Stränge angelagert. Abbildung 41e zeigt einen Ausschnitt mit den kleinen Fäden, die ca. 2 nm hoch sind, jedoch stimmt die Länge nicht mit den errechneten ca. 200 nm bei 700 bp überein. Jedoch ist ungeklärt, inwiefern die Lachsspermien-DNA die Emulgation im Ultraschallbad toleriert. Dies muss in der Zukunft untersucht werden. Des Weiteren handelt es sich bei der Lachsspermien-DNA um Fragmente. Es ist möglich, dass die Fragmente anders als erwartet miteinander hybridisieren und längere/kürzere Strukturen ausbilden. Entgegen der Erwartung konnte in dem Partikel keine DNA detektiert werden. Eventuell entsteht der Partikel und die Stränge durch das Zusammenziehen der Lösung aufgrund des negativen Oberflächenpotentials, sodass die DNA gestreckt wird. Der Versuch zeigt, dass es möglich ist DNA mittels elektrischer Felder zu positionieren, jedoch gibt es viel Entwicklungsbedarf. Das gilt es in weiterführenden Studien zu untersuchen.

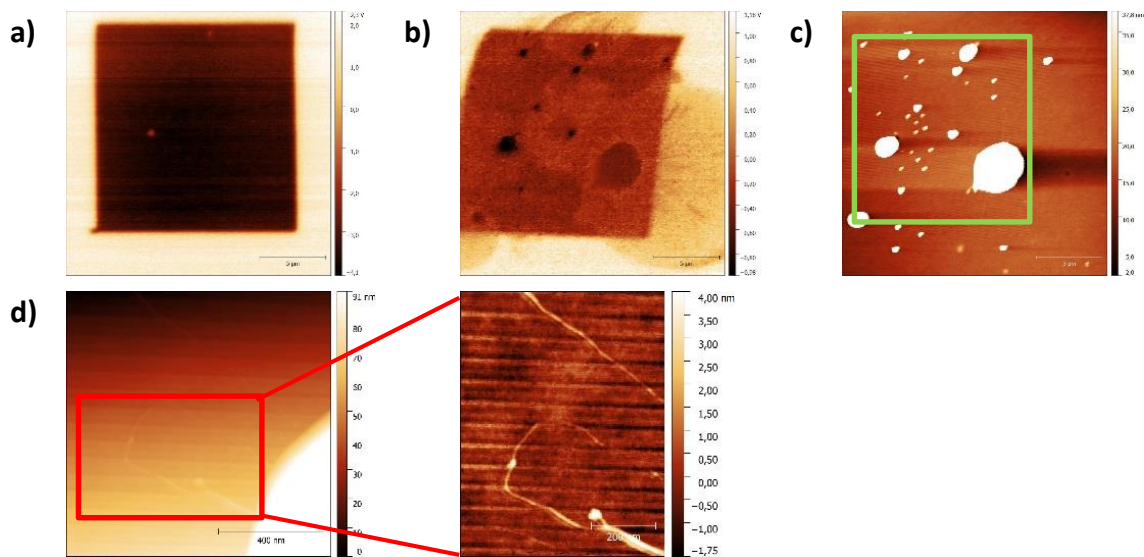


Abbildung 41: Positionierung der Lachsspermien-DNA mittels Nanoxerographie und EDL

Die elektrostatische Aufladung der PMMA-Oberfläche ($15 \times 15 \mu\text{m}^2$) erfolgt mittels CM und die Messung mittels KPFM(a). b) zeigt die KPFM-Messung nach der Positionierung der Lachsspermien-DNA und c) die topographische Aufnahme des Bereiches. d) stellt Details dar (Skala: a) – c): $5 \mu\text{m}$, d): 400 nm und Detail: 200 nm).

7 Zusammenfassung

Mithilfe der Tests an Lachsspermien-DNA konnten geeignete Parameter für die DNA-Origami-Immobilisierung erstellt und die Interaktionen zwischen Mica und dsDNA beschrieben werden. Die Fluoreszenzmethode als AFM-Alternative konnte nicht etabliert werden, da das erhaltene Fluoreszenzsignal in den relevanten Konzentrationen aufgrund der Umgebungsbedingungen zu schwach ausfiel.

Die Strukturierung der Wafer konnte bis zur Herstellung der Silizium-Master für die tPads® umgesetzt werden. Der NIL-Prozess und die Etablierung des 2-Lack-Systems befinden sich in der Entwicklung.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die physikalisch chemischen Parameter und deren Einfluss auf die DNA-Origami-Immobilisierung bei gleichbleibender Konzentration, Präparation und Magnesiumgehalt von 32,75 mM charakterisiert. Dabei wurde festgestellt, dass die Bindeintensität mit fallendem R_a -Wert steigt, die Modifikation der Siliziumdioxidoberfläche mittels Sauerstoffplasma die Oberfläche glättet und dadurch Hydroxylgruppen zur magnesium-basierten Bindung entstehen. Zudem wurde gezeigt, dass DNA-Origami nicht ausschließlich auf hydrophilen Oberflächen haftet, sondern auf hydrophoben. Die Messungen des negativen Potentials der hydrophoben Oberflächen legen die Vermutung nahe, dass hier eine unspezifische Bindung aufgrund elektrostatischer Wechselwirkungen vorliegt und dass in diesem Fall die gewählte Spülung nicht ausreicht, um diese Bindung zu lösen. Je niedriger das Potential der hydrophoben Oberflächen, umso höher ist die Anziehung des Wassers durch die Van-der-Waals-Wechselwirkungen und umso schlechter kann die Bindung gelöst werden. Des Weiteren ist die DLC-Oberfläche sehr glatt, was eine hohe Bindeintensität impliziert. Außerdem scheinen elektrostatische Wechselwirkungen einen Einfluss auf die Selbstassemblierung zu haben, denn die 2D-Strukturen liegen auf der DLC-Oberfläche mit einem sehr negativen Oberflächenpotential verformt vor.

Demnach konnte die Arbeitshypothese bestätigt werden, dass die Immobilisierung vom Oberflächenpotential, der Rauigkeit des Substrates und der molekularen Struktur der DNA-Origami abhängig ist.

Für den zu prüfenden Ansatz nach *Helke et al.* gilt folgendes: die verwendete DLC-Oberfläche eignet sich aufgrund der glatten Oberfläche, dem negativen Potential und der damit verbundenen flächenmäßig dichten DNA-Origami-Anlagerung nicht als abweisende Schicht. HMDS könnte aufgrund der hydrophoben Methylgruppen als Nichtanlagerungsschicht fungieren, aber es ist flüchtig und es können keine DNA-Origami kompatible Kavitäten hergestellt werden. Das CF-Polymer weist einen hohen R_a -Wert und eine schwache unspezifische Anlagerung in Spülrichtung auf. Daher ist dies die geeignetste Oberfläche für die Nicht-Anlagerung. Die Parameter nach Modifikation 2 können im weiteren Verlauf der Strukturierung der Wafer genutzt werden, um hydrophile Kavitäten zu schaffen.

Prinzipiell ist die Immobilisierung von einer Vielzahl von Parametern abhängig, sodass verstärkt der technische Ansatz zum Tragen kommt. Der *Lift-off* der tPads® gestaltet sich jedoch schwierig, da die tPads® außer nach der Aceton-Spülung deformiert sind. Aufgrund des Vergleiches mit der Literatur liegt die Vermutung nahe, dass die Strukturen aufgrund ihrer instrinsischen Spannungen den Prozess nicht überstehen. Die entsprechende Stabilität könnten die 6HB aufweisen. Dies muss in weiterführenden Studien untersucht werden. Für den molekularen *Lift-off* ist es unabdingbar, dass die hydrophilen Kavitäten und das Protokoll eine optimale Bedeckung der DNA-Origami aufweist. Nur dann stellt es eine umsetzbare Methode dar, die darauf abzielt die Nicht-Anlagerungsschichten zu umgehen und so unspezifische Bindungen zu entfernen. Zum jetzigen Zeitpunkt ist diese Methode als unrealistisch einzuschätzen.

Sehr vielversprechend scheint hingegen die Methode der Nanoxerographie und EDL zu sein, da die Positionierung aufgrund elektrostatischer Wechselwirkungen der Lösung und des Feldes vereinfacht ist. Dabei entfallen die zahlreichen Parameter, die einen Einfluss auf die Immobilisierung der DNA-Origami haben. Hiermit konnte eine erste Deposition von Lachsspermien-DNA auf PMMA durchgeführt werden.

8 Ausblick

Die präzise und selektive Immobilisierung von DNA-Origami ist sehr komplex und geprägt von zahlreichen Abhängigkeiten. Die vorliegende Arbeit konnte zeigen, dass die Bindeintensität der DNA-Origami durch die Rauigkeit einer Oberfläche, die Substratfunktionalisierung und die molekulare Struktur der DNA-Origami beeinflusst werden. Es konnte eine Anlagerung an hydrophobe Oberflächen beobachtet werden. Auf diesen Oberflächen wurden negative Oberflächenpotential gemessen, die das Wasser der Origami-Lösung anziehen und so eine unspezifische Bindung – ohne Hydroxylgruppen – entsteht. Die erzielten Ergebnisse legen den Grundstein für die entsprechende Modifikation der hydrophilen Siliziumdioxid-Oberflächen und die passende Materialauswahl für eine Nichtanlagerungsschicht, so dass der Ansatz nach *Helke et al.* umgesetzt werden kann, sobald der NIL-Prozess etabliert ist. Des Weiteren zeigen alternative Integrationstechnologien wie die Nanoxerographie, dass die komplexen Parameter der magnesium-basierten Anlagerung teilweise umgangen werden können.

Für die Zukunft können einerseits die Protokolle für jede einzelne Struktur angepasst werden. Andererseits scheint es erfolgsversprechender hinsichtlich einer selektiver Platzierung die magnesium-basierte Immobilisierung zu umgehen, da die Ergebnisse unzureichend reproduzierbar sind und somit ist ein mikrofluidischer Integrationsansatz nicht umsetzbar. Es könnte eine kovalente Bindung über Thiolgruppen oder über SAMs realisiert werden. Ein weiterer kritischer Punkt ist die molekulare Stabilität der tPads®. Daher sollten die selektive Immobilisierung und die vorhergehende Funktionalisierung der stabileren Pads und 6HBs forciert werden.

Auf diesem Wege wäre es möglich, die Ausrichtung der DNA-Origami entlang der Spülrichtung auf CF auszunutzen. Es könnten Kavitäten in einer Richtung geschaffen werden, die eingangs funktionalisiert mit einem Polymer oder einer funktionellen Gruppe ausgestattet werden, sodass die 6HB daran binden und sich im weiteren Spülvorgang innerhalb der Kavität strecken.

Des Weiteren könnten superhydrophobe und sehr raue Oberflächen getestet werden, die als Nichtanlagerungsschicht in Frage kommen. Ebenso kommen Oberflächen infrage, deren

Oberflächenpotential auf die Abweisung der DNA-Origami ausgerichtet ist. In dieser Richtung müssen jedoch noch die genauen Zusammenhänge erforscht werden.

Ein großes Entwicklungspotential sieht die vorliegende Arbeit jedoch in der Nanoxerographie, die *Bottom-Up* und *Top-Down* innovativ kombiniert.

Literatur

- Alberts, B., Bray, D., Hopkin, K., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., . . . Walter, P. (2012). *Lehrbuch der Molekularen Zellbiologie*. (J. Graw, Hrsg.) Wiley-VCH.
- Albrecht, B., Hautzinger, D. S., Krüger, M., Elwenspoek, M., Müller, K. M., & Korvink, J. G. (2010). Adsorption studies of DNA Origami on silicon dioxide. Enschede: 21st Micromechanics and Micro Systems Europe workshop (MME 2010).
- Allemand, J.-F., Bensimon, D., Jullien, L., & Croquette, V. (1997). pH-dependent specific binding and combing of DNA. *Biophysical Journal*, 73, S. 2064-2070.
- Alloyeau, D., Ding, B., Ramasse, Q., & Kisielowski, C. (2011). Direct imaging and chemical analysis of unstained DNA origami. *The Royal Society of Chemistry*, 47, S. 9375–9377.
- Balestra, F., & Clerc, R. (kein Datum).
<http://www.sinano.eu/data/document/introduction.pdf>. Abgerufen am 25. November 2015 von <http://www.sinano.eu>
- Becerril, H., & Woolley, A. (2009). DNA-templated nanofabrication. *Royal Society of Chemistry*, 38, S. 329-337.
- Benke, A. (24. April 2007). Aufbau nanoskopischer Netzwerke aus DNA und Bindeproteinen. Leipzig.
- Blackburn, G., & Gait, M. (1996). *Nucleic acids in chemistry and biology*. Oxford University Press.
- Blanco, E. M., Nesbitt, S. A., Horton, M. A., & Mesquida, P. (2007). A Multiprotein Microarray on Silicon Dioxide Fabricated by Using Electric-Droplet Lithography. *Advanced Materials*, 19, S. 2469–2473.
- Chou, S., Krauss, P. R., & Renstrom, P. J. (1995). Imprint of sub-25 nm vias and trenches in polymers. *Applied Physics Letters*, 67, S. 3114-3116.
- Endo, M., Hidaka, K., & Sugiyama, H. (2011). Direct AFM observation of an opening event of a DNA cuboid constructed via a prism structure. *The Royal Society of Chemistry*, 9, S. 2075-2077.
- Endo, M., Yang, Y., & Sugiyama, H. (2012). DNA origami technology for biomaterials applications. *The Royal Society of Chemistry*, 1, S. 347-360.

- Fischer, F., Henning-Knechtel, A., & Mertig, M. (13. März 2015). Investigating the aggregation behaviour of DNA origami frames. *Phys. Status Solidi*.
- Fürstenberg, A., Julliard, M. D., Deligeorgiev, T. G., Gadjev, N. I., Vasilev, A. A., & Vauthey, E. (2006). Ultrafast Excited-State Dynamics of DNA Fluorescent Intercalators: New Insight into the Fluorescence Enhancement Mechanism. *Journal of the American Chemical Society*, 128, S. 7661-7669.
- Gerlach, G., & Dötzel, W. (2006). *Einführung in die Mikrosystemtechnik*. Dresden und Chemnitz: Fachbuchverlag Leipzig im Carl Hanser Verlag.
- Gessner, T. (2007). Skript: Technologien der Mikroelektronik.
- Gopinath, A., & Rothmund, P. K. (2014). Optimized Assembly and Covalent Coupling of Single-Molecule DNA Origami Nanoarrays. *ACS Nano*.
- Gou, L. (2004). Recent progress in nanoimprint technology and its applications. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 37, S. 123–141.
- Guo, J. L. (2007). Nanoimprint Lithography: Methods and Material Requirements. *Advanced Materials*, 19, S. 495-513.
- Hamada, S., & Murata, S. (2009). Substrate-Assisted Assembly of Interconnected Single-Duplex DNA. *Angewandte Chemie*, 121, S. 6952 –6955.
- Hansma, H., Pietrasanta, L., Golan, R., Sitko, J., Viani, M., Palocz, G., . . . Hansma, P. (2000). Recent Highlights from Atomic Force Microscopy of DNA. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 17, S. 271-275.
- Helke, C., Fischer, F., Lakatos, M., Nestler, J., Mertig, M., & Gessner, T. (2014). Large-scale nanostructuring for microfluidic DNA origami integration. *Materials Today Proceedings*, eingereicht.
- Henning, A. (28. November 2012). Einsatz von einzelsträngigen DNS-Templaten zur Erstellung funktioneller DNS-Nanostrukturen. Dresden.
- Invitrogen Life Science. (kein Datum). Abgerufen am 4. Juni 2015 von <http://www.b2b.invitrogen.com/site/us/en/home/References/Molecular-Probes-The-Handbook/Nucleic-Acid-Detection-and-Genomics-Technology/Nucleic-Acid-Stains.html>
- Kershner, R. J. (2009). Placement and orientation of individual DNA shapes on lithographically patterned surfaces. *Nature Nanotechnology*, 4, S. 557-561.

- Kim, D., Kilchherr, F., Dietz, H., & Bathe, M. (2014). Quantitative prediction of 3D solution shape and flexibility of nucleic acid nanostructures. *Nucleic Acids Research*, 40, S. 2862–2868.
- Kim, H., Surwade, P., Powell, A., O'Donnell, C., & Liu, H. (2014). Stability of DNA Origami Nanostructure under Diverse Chemical Environments. *American Chemical Society*, 26, S. 5265–5273.
- Kleiner, A. (2012). Mechanical and electrical investigations of thin polymer films by variable-temperature force microscopy. Ulm.
- Marie, D., Vaulot, D., & Partensky, F. (1996). Application of the Novel Nucleic Acid Dyes YOYO-1, YO-PRO-1, and PicoGreen for Flow Cytometric Analysis of Marine Prokaryotes. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, S. 1649-1655.
- Melander, W., & Horvath, C. (1977). Salt effect on hydrophobic interactions in precipitation and chromatography of proteins: an interpretation of the lyotropic series. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 183, S. 200-215.
- Mesquida, P., & Blanco, E. M. (2010). Microdroplets as a tool for 'soft' patterning. *Journal Nanoengineering and Nanosystems*, 223, S. 113-119.
- Mesquida, P., Blanco, E., & McKendry, R. (2006). Patterning Amyloid Peptide Fibrils by AFM Charge Writing. *Langmuir*, 22, S. 9089-9091.
- Minne, S. C. (1995). Fabrication of 0.1 μ m metal oxide semiconductor field-effect transistors with the atomic. *Applied Physics Letters*, 66, S. 703-705.
- Mohammad, M., Muhammad, M., & Dew, S. (2012). Fundamentals of Electron Beam Exposure and Development. In *Nanofabrication* (S. 11-41). Wien: Springer-Verlag.
- Nazarpour, S. (2014). *Thin Films and Coatings in Biology*. Springer Verlag.
- Pillers, M., Goss, V., & Lieberman, M. (2014). Electron-Beam Lithography and Molecular Lift-off for Directed. *American Chemical Society*, 47, S. 1759–1767.
- Piner, R., Zhu, J., Xu, F., Hong, S., & Mirkin, C. (1999). "Dip-Pen" Nanolithography. *Science*, 283, S. 661-663.
- Pinheiro, A., Han, D., Shih, W., & Yan, H. (2011). Challenges and opportunities for structural DNA nanotechnology. *Nature Nanotechnology*, 6, S. 763-772.
- Rothemund, P. W. (2006). Folding DNA to create nanoscale shapes and patterns. *Nature*, 440, S. 297-302.
- Seeman, N. C. (1982). Nucleic Acid Junctions and Lattices. *J. theor. Biol.*, 99, S. 237-247.

- Seeman, N. C. (2010). Nanomaterials Based on DNA. *Annu Rev Biochem.*, 69, S. 65–87.
- Seeman, N. C., & Chen, J. H. (1991). Synthesis from DNA of a molecule with the connectivity of a cube. *Nature*, 350, S. 631 - 633.
- Senden, T., & Ducker, W. (1992). Surface Roughness of Plasma-Treated Mica. *Langmuir*, 8, S. 733-735.
- Stemmer, A. e. (2008). Electric charges and forces in atomic force microscopy and nano-xerography. *Journal of Physics: Conference Series*, 142, S. 1-5.
- Sun, X., Ko, S., Zhang, C., Ribbe, A., & Mao, Z. (2009). Surface-Mediated DNA Self-Assembly. *American Chemical Society*, 131, S. 13248–13249.
- Terriza, A., Álvarez, R., Borrás, A., Cotrino, J., Yubero, F., & González-Elípe, A. (2012). Roughness assessment and wetting behavior of fluorocarbon surfaces. *Journal of Colloid and Interface Science*, 376, S. 274–282.
- Watson, J. D., & Crick, F. H. (1953). Molecular Structure of Nucleic Acids. *Nature*, 171, S. 737-738.
- Woo, S., & Rothemund, P. (2014). Self-assembly of two-dimensional DNA origami. *Nature Communications*, 5:4889.
- Xia, Y., & Whitesides, G. M. (1998). Soft Lithography. *Angewandte Chemie Int. Ed.*, 37, S. 550-575.

Anlagen

Chemikalien/Geräte/Software

Chemikalie	Konzentration	Hersteller/Firma
Salmon Sperm DNA (ca. 700 bp lang)	10mg/ml	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
YOYO-1	1mM	Lifetechnologies GmbH
DNA-Origami	30 nM	TU Dresden
Fluorinert	FC-770	Sigma-Aldrich GmbH
TAE-Puffer	40mM Trizma Base, 20mM Essigsäure, 2mM EDTA, 12,5mM Magnesiumacetat, pH 8 bis 8,3	TU Dresden
TE-Puffer	5mM Tris, 35mM MgCl ₂ , pH 8,35	Eigene Herstellung
Tris		CARL ROTH GMBH + CO. KG
MgCl ₂		Sigma-Aldrich Chemie GmbH

Geräte	Typ	Hersteller/Firma
pH-Meter	Mettler Toledo FE20	Mettler-Toledo Intl. Inc.
AFM	Digital Instruments Dimension 3000, Model: 3000-1-PAL, serial: #462EX Agilent Technologies 5600LS AFM	Digital Instruments Agilent Technologies, Inc.
Mikroskop	Olympus IX 51	Olympus K.K.

Autoklav	Systec DX23	Systec GmbH Labor-Systemtechnik
Waage	OHAUS Discovery DV 215	OHAUS Corporation
Ultraschallbad	VWR Ultrasonic Cleaner	VWR International
Netzgerät	Agilent E3631A	Agilent Technologies, Inc.

Software:

- StreamMotion
- Gwyddion 2.42
- NanoScope III Analysis V531r1

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe.

Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus Quellen entnommen wurden, sind als solche kenntlich gemacht.

Diese Arbeit wurde in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Chemnitz, den 30. November 2015

Sophie Thamm

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die mich während der Anfertigung dieser Masterarbeit unterstützt und auf meinem Weg begleitet haben.

Zuerst gebührt mein Dank Herrn Dipl.-Ing. Christian Helke, der meine Masterarbeit betreut und begutachtet hat. Für die hilfreichen Anregungen, die konstruktive Kritik und die moralische Unterstützung bei der Erstellung dieser Arbeit möchte ich mich herzlich bedanken. Des Weiteren danke ich Frau Prof. Petra Radehaus, die mein Thema seitens der Hochschule betreut und unterstützt hat.

Ein besonderer Dank gilt Julia Hann für Ihren Beistand und Ihre Kompetenz am AFM. Weiterhin danke ich ihr für die Unterstützung bei der Nanoxerographie.

Weiterhin danke ich allen Mitarbeitern des ZfM und des ENAS, die meine Arbeit unterstützt haben. Ebenso danke ich den Mitarbeitern der TU Dresden, Franziska Fischer und Dr. Andreas Heerwig, welche die DNA-Origami zur Verfügung gestellt und mir mit ihrem fachlichem Rat geholfen haben.

Ebenfalls möchte ich mich bei allen Mitgliedern der Abteilung MDI bedanken, die mir stets freundlich und hilfsbereit zur Seite standen.

Anschließend danke ich meinen Eltern, Udo und Jeannette Jähn, meiner gesamten Familie für all die Unterstützung in jeglicher Hinsicht über die Jahre meines Studiums und meinen Freunden, deren Ermutigung außerordentlich war.

Meiner lieben Kyra gebührt ein besonderer Dank, da sie so ein tolles Mädchen ist und Nachsicht mit ihrer Mama hat.